



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de la actividad bactericida de los
desinfectantes green desinfectant, forward e
hipoclorito de sodio en cepas ATCC y cepas aisladas de
superficies de áreas quirúrgicas de dos clínicas de
Lima**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Joel Carlos ELIAS PAREDES

ASESOR

Ruth GARCÍA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Elias, J. (2017). *Evaluación de la actividad bactericida de los desinfectantes green desinfectant, forward e hipoclorito de sodio en cepas ATCC y cepas aisladas de superficies de áreas quirúrgicas de dos clínicas de Lima*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

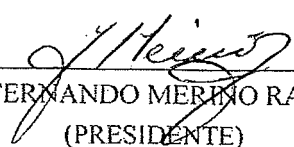
Siendo las 18:39 horas del 27 de abril de 2017, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de JOEL CARLOS ELÍAS PAREDES.

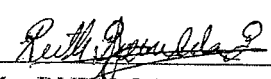
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 025-EPMP-2016, el titulado expuso su tesis: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS DESINFECTANTES GREEN DESINFECTANT, FORWARD E HIPOCLORITO DE SODIO EN CEPAS ATCC Y CEPAS AISLADAS DE SUPERFICIES DE ÁREAS QUIRÚRGICAS DE DOS CLÍNICAS DE LIMA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: sobresaliente.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo a JOEL CARLOS ELÍAS PAREDES, se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

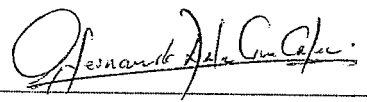
Siendo las 20:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 27 de abril de 2017.


Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(PRESIDENTE)


Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(ASESORA)


Mg. JORGE LEON QUISPE
(MIEMBRO)


Blgo. AUGUSTO DE LA CRUZ CALVO
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primeramente a Dios por la vida que nos da cada día, a mis padres por apoyarme en todo lo que emprendo, a la profesora Ruth García de la Guarda por el asesoramiento brindado para la realización de la tesis y a los compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología que me ayudaron, así como a la empresa SLIM SG por el financiamiento.

ABREVIATURAS

ADBAC: Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride

ATCC: American Type Culture Collection

BZK: Cloruro de Benzalconio

CEN: Comité Europeo de Normalización

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CRA: Agente liberador de cloro

DDAC: Didecyl dimethyl ammonium chloride

ERV: Enterococos resistentes a vancomicina

HBV: Virus de la hepatitis B

IIH: Infecciones Intrahospitalarias

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

MIC: Concentración Mínima Inhibidora

NaDCC: Dicloroisocianurato de sodio

NaOCl: Hipoclorito de sodio

QAC: Compuestos de amonio cuaternario

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- MARCO TEÓRICO.....	3
II.1.- Papel de la desinfección de superficies en la prevención de infecciones intrahospitalarias.....	3
II.1.1.- Infecciones intrahospitalarias (IIH).....	3
II.1.2.- Factores que influyen en las infecciones intrahospitalarias.....	3
II.1.2.1. El agente microbiano.....	3
II.1.2.2. Vulnerabilidad de los pacientes.....	4
II.1.2.3. Factores ambientales.....	5
II.1.2.4. Resistencia bacteriana.....	6
II.1.3.- Importancia de la desinfección de superficies.....	7
II.1.4.- Bacterias aisladas de superficies ambientales hospitalarias.....	8
II.2.- Desinfectantes.....	11
II.2.1. Amonios cuaternarios.....	12
II.2.2. Hipoclorito de sodio.....	17
II.3.- Evaluación de desinfectantes.....	20
II.4.-Neutralizantes.....	25
II.5.-Antecedentes.....	27
III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
III.1. HIPÓTESIS.....	30
III.2. OBJETIVOS.....	30
III.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
III.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
IV.1. MATERIALES.....	31
IV.1.1. Material biológico.....	31
IV.2. MÉTODOS.....	31
IV.2.1. Toma de muestra.....	31
IV.2.2. Identificación de bacterias aisladas.....	32
IV.2.3. Actividad bactericida de los desinfectantes.....	33
IV.2.3.1. Preparación de suspensiones bacterianas a partir de cepas ATCC y cepas aisladas e identificadas de superficie.....	33
IV.2.3.2. Ensayo de neutralización.....	34
IV.2.3.3. Ensayo para determinar la CMB de los desinfectantes.....	36
V.-RESULTADOS.....	38
V.1. Bacterias aisladas de las superficies.....	38
V.2. Ensayo de neutralización.....	45
V.3. Ensayo de actividad bactericida de desinfectantes.....	50
VI.-DISCUSIÓN.....	61
VII.-CONCLUSIONES.....	65
VIII.- RECOMENDACIONES.....	66
IX.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
X.-ANEXO.....	77

RESUMEN

Se realizó el aislamiento e identificación de bacterias patógenas oportunistas a partir de superficies ambientales del área de quirófano de dos clínicas de Lima, las cuales fueron utilizadas en la evaluación de los desinfectantes. La toma de muestra fue realizada mediante el método de hisopado, empleando hisopos de algodón estériles se frotaron zonas delimitadas de 200 cm², luego los hisopos fueron colocados en tubos con 5ml de caldo tripticasa de soya e incubados a 37 °C por 24 horas, cada tubo se sembró por estriado en placas de Agar sangre, Agar Cetrimide, Agar manitol salado y Agar Mac Conkey y fueron incubados a 37 °C por 24-48 horas. Las cepas bacterianas fueron identificadas en base a las recomendaciones del Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias, al Manual de determinación Bacteriológica Bergey's y con la utilización del API 20E. En el aislamiento se encontraron diferencias y semejanzas en la flora bacteriana aislada de las superficies ambientales en dos clínicas de Lima. Las especies bacterianas aisladas de la clínica A fueron: *Staphylococcus coagulans* negativos (8/26) (31%), *Pseudomonas sp.* (2/26) (7%), *Escherichia coli* (1/26) (4%), *Enterobacter cloacae* (1/26) (4%), *Enterobacter aerogenes* (1/26) (4%) y *Bacillus sp.* (13/26) (50%); y las especies bacterianas aisladas de las superficies ambientales de la clínica B fueron: *Staphylococcus coagulans* negativo (21/34) (62%), *Enterobacter cloacae* (1/34) (3%) y *Bacillus sp.* (12/34) (35%). Para la evaluación de la actividad bactericida en el tiempo por el método dilución /neutralización se utilizaron neutralizantes para bloquear la actividad bactericida del desinfectante luego del tiempo de enfrentamiento con éste. La concentración de neutralizantes con mayor efectividad para las cepas ensayadas fueron polysorbato 80 al 2% más lecitina de soya al 2,5%, para los desinfectantes a base de amonio cuaternario, Green Disinfectant y Forward, y el tiosulfato de sodio al 1,0% como neutralizante para el hipoclorito de sodio.

Las bacterias patógenas oportunistas que se aislaron, se utilizaron junto con cepas bacterianas estándar de American Type Culture Collection (ATCC), en la evaluación de la actividad bactericida de los desinfectantes. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), tomándose esta como la dilución del desinfectante que produce una reducción de al menos 5 unidades logarítmicas en la población bacteriana. El tiempo de contacto con los desinfectantes fue de 5 minutos \pm 10 segundos y temperatura de incubación 20 ± 1 °C por el método dilución /neutralización. La mayor CMB expresada en porcentaje para Green Disinfectant (%v/v) para las cepas ensayadas fue 0.0521, para el desinfectante Forward (%v/v) fue 0.6250; y finalmente para el hipoclorito de sodio (%p/v) fue 0.0050. Se concluyó que los desinfectantes utilizados poseen actividad bactericida y fueron eficaces en ensayos *in vitro* contra las cepas aisladas de las superficies ambientales de áreas quirúrgicas y cepas ATCC. El desinfectante más efectivo de los ensayados fue el hipoclorito de sodio.

Palabras claves: Áreas quirúrgicas, infecciones intrahospitalarias, desinfección de superficies, bacterias patógenas oportunistas, desinfectante, neutralizante y concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

Isolation and identification of opportunistic pathogenic bacteria were performed from environmental surfaces of the operating room area of two Lima clinics, which were used in the evaluation of disinfectants. Sampling was done using the swab method, using sterile cotton swabs rubbed delimited areas of 200 cm², then the swabs were placed in tubes with 5 ml of trypticase soy broth and incubated at 37 °C for 24 hours, each tube was streaked onto surface of blood agar plates, Cetrimide Agar, salted mannitol agar and Mac Conkey Agar and were incubated at 37 ° C for 24-48 hours. Bacterial strains were identified based on the recommendations of the Manual of Bacteriological Procedures in Intrahospital Infections, the Bergey's Bacteriological Determination Manual and the use of API 20E. In isolation, differences and similarities were found in bacterial flora isolated from environmental surfaces in two clinics in Lima. The bacterial species isolated from clinical A were: *Staphylococcus* coagulase negative (8/26) (31%), *Pseudomonas* sp. (2/26) (7%), *Escherichia coli* (1/26) (4%), *Enterobacter cloacae* (1/26) (4%), *Enterobacter aerogenes* (1/26) (4%) and *Bacillus* sp. (13/26) (50%); and bacterial species isolated from the environmental surfaces of clinic B were: *Staphylococcus* coagulase negative (21/34) (62%), *Enterobacter cloacae* (1/34) (3%) and *Bacillus* sp. (12/34) (35%). For the evaluation of the bactericidal activity in the time by the dilution / neutralization method, neutralizers were used to block the bactericidal activity of the disinfectant after the time of confrontation with it. The most effective neutralizing concentrations for the strains tested were 2% polysorbate 80 plus 2.5% soy lecithin, for disinfectants based on quaternary ammonium, Green Disinfectant and Forward, and sodium thiosulfate at 1.0 % as neutralizing for sodium hypochlorite.

Opportunistic pathogenic bacteria that were isolated, were used together with standard bacterial strains from the American Type Culture Collection (ATCC), in the evaluation

of the bactericidal activity of disinfectants. The minimum bactericidal concentration (CMB) was determined, being taken as the dilution of the disinfectant that produces a reduction of at least 5 log units in the bacterial population. The contact time with the disinfectants was 5 minutes \pm 10 seconds and incubation temperature 20 ± 1 ° C by the dilution / neutralization method. The highest CMB expressed as a percentage for Green Disinfectant (% v / v) for the strains tested was 0.0521; for the Disinfectant Forward (% v / v) was 0.6250; and finally for sodium hypochlorite (% w / v) was 0.0050. It was concluded that the disinfectants that have been used had bactericidal activity and were effective in in vitro tests against strains isolated from the environmental surfaces of surgical areas and strains ATCC. The most effective disinfectant of the tested was sodium hypochlorite.

Key words: Surgical areas, intrahospital infections, surface disinfection, opportunistic pathogenic bacteria, disinfectant, neutralizing agent and minimal bactericidal concentration.

I. INTRODUCCIÓN

El ambiente hospitalario tiene un papel importante en la transmisión de patógenos y puede ser causa directa de la infección de los pacientes y los brotes epidémicos, llamándose a estas infecciones intrahospitalarias o nosocomiales (Bolis, 2007).

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) constituyen un problema de salud pública tanto a nivel nacional como mundial, dado que se asocian a un incremento de la mortalidad, morbilidad y a los costos tanto hospitalarios como para los pacientes, sus familias y la sociedad (Ducel *et al.*, 2002).

Las infecciones intrahospitalarias son de distribución mundial y se presentan en todos los hospitales de alto y bajo nivel de complejidad. Los microorganismos responsables más frecuentes son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Enterococcus sp.* (Yagui, 2000).

En el ambiente hospitalario se distinguen claramente las áreas sucias y limpias, según el tipo de procedimiento que en ellas se realiza. Dentro de las áreas limpias tienen un especial significado las áreas críticas; entre las más importantes está el área quirúrgica, que alberga pacientes de alto riesgo. En ellas los pacientes son sometidos a manipulaciones que favorecen el contacto y posterior infección con microorganismos presentes en el ambiente (Calderón, 1989).

Debido a que en los últimos tiempos la desinfección ambiental está siendo considerada un factor importante en la prevención de las IIH, es de suma importancia la evaluación de los desinfectantes que se utilizan para la desinfección de los

diferentes ambientes hospitalarios, especialmente los críticos, como el área de quirófano.

En este sentido, el presente trabajo está orientado a evaluar la eficiencia de los desinfectantes de uso clínico frente a las bacterias patógenas oportunistas presentes en las superficies del área de quirófano de dos instituciones hospitalarias, con la finalidad de realizar el diseño de un plan de desinfección adecuado y la rotación de desinfectantes en su uso en cada hospital, lo cual contribuirá a la prevención de IIH.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Papel de la desinfección de superficies en la prevención de infecciones intrahospitalarias

II.1.1. Infecciones intrahospitalarias (IIH):

Llamadas también infecciones nosocomiales, son un problema actual y en constante evolución en todo el mundo. Bajo esta denominación se agrupa un conjunto heterogéneo de enfermedades infecciosas cuyo denominador común es el haber sido adquiridas en un hospital (Ministerio de salud, 2004).

Una Infección Intrahospitalaria puede definirse de la manera siguiente: una infección contraída en el hospital por un paciente internado por una razón distinta de esa infección. Una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado. Comprende las infecciones contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento (Ducel *et al.*, 2002).

II.1.2. Factores que influyen en las infecciones intrahospitalarias:

II.1.2.1. El agente microbiano

El paciente está expuesto a una gran variedad de microorganismos durante la hospitalización. El contacto entre el paciente y un microorganismo, en sí, no produce necesariamente una enfermedad clínica, puesto que hay otros factores que influyen en la naturaleza y frecuencia de las infecciones nosocomiales. La posibilidad de exposición conducente a infección depende, en parte, de las características de los microorganismos, incluso la resistencia a los antimicrobianos, la virulencia intrínseca y la cantidad de material infeccioso (inóculo). Una gran cantidad de bacterias, virus,

hongos y parásitos diferentes pueden causar infecciones nosocomiales. Las infecciones pueden ser causadas por un microorganismo contraído de otra persona en el hospital (infección cruzada) o por la propia flora del paciente (infección endógena). La infección por algunos microorganismos puede ser transmitida por un objeto inanimado o por sustancias recién contaminadas provenientes de otro foco humano de infección (infección ambiental). Antes de la introducción de las prácticas básicas de higiene y de los antibióticos al ejercicio de la medicina, las infecciones nosocomiales, en su mayoría, se debían a agentes patógenos de origen externo (enfermedades transmitidas por los alimentos y el aire, gangrena gaseosa, tétanos, etc.) o eran causadas por microorganismos externos a la flora normal de los pacientes (por ejemplo, difteria, tuberculosis) (Ducel *et al.*, 2002).

Los diferentes tipos de microorganismos difieren en sus respuestas a las sustancias desinfectantes, debido en parte a la presencia de estructuras de barrera como membrana y pared celular, que pueden actuar interfiriendo en la penetración de fluidos y solutos (Hernández, 2006).

II.1.2.2. Vulnerabilidad de los pacientes

Los factores de importancia para los pacientes que influyen en la posibilidad de contraer una infección comprenden la edad, el estado de inmunidad, cualquier enfermedad subyacente y las intervenciones diagnósticas y terapéuticas. En las épocas extremas de la vida – la infancia y la vejez – suele disminuir la resistencia a la infección. Los pacientes con enfermedad crónica, como tumores malignos, leucemia, diabetes mellitus, insuficiencia renal o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) tienen una mayor vulnerabilidad a las infecciones por agentes patógenos oportunistas. Estos últimos son infecciones por microorganismos normalmente inocuos, por ejemplo, que forman parte de la flora bacteriana normal del ser humano, pero pueden llegar a ser patógenos cuando se ven comprometidas las defensas inmunitarias del organismo. Los agentes inmunodepresores o la irradiación pueden reducir la resistencia a la

infección. La malnutrición también presenta un riesgo. Muchos procedimientos diagnósticos y terapéuticos modernos, como biopsias, exámenes endoscópicos, cateterización, intubación/respiración mecánica y procedimientos quirúrgicos y de succión aumentan el riesgo de infección. Ciertos objetos o sustancias contaminados pueden introducirse directamente a los tejidos o a los sitios normalmente estériles, como las vías urinarias y las vías respiratorias inferiores (Ducel *et al.*, 2002).

II.1.2.3. Factores ambientales

En el ambiente hospitalario se distinguen claramente áreas sucias y áreas limpias, según el tipo de procedimiento que en ellas se realiza o las distintas prácticas de higiene o saneamiento a las que son sometidas. Siendo los lugares húmedos de especial importancia, puesto que esta condición resulta necesaria para la sobrevivencia de la mayoría de bacterias (en especial, los bacilos Gram negativos) (Calderón, 1989).

Los establecimientos de atención de salud son un entorno donde se congregan las personas infectadas y las expuestas a un mayor riesgo de infección. Los pacientes hospitalizados que tienen infección o son portadores de microorganismos patógenos son focos potenciales de infección para los demás pacientes y para el personal de salud. Los pacientes que se infectan en el hospital constituyen otro foco de infección. Las condiciones de hacinamiento dentro del hospital, el traslado frecuente de pacientes de una unidad a otra y la concentración de pacientes muy vulnerables a infección en un pabellón (por ejemplo, de recién nacidos, pacientes quemados, cuidados intensivos) contribuyen a la manifestación de infecciones nosocomiales. La flora microbiana puede contaminar objetos, dispositivos y materiales que ulteriormente entran en contacto con sitios vulnerables del cuerpo de los pacientes. Además, se siguen diagnosticando nuevas infecciones bacterianas, por ejemplo, por bacterias

transmitidas por el agua (micobacterias atípicas), además de infecciones víricas y parasitarias (Ducel *et al.*, 2002).

II.1.2.4. Resistencia bacteriana

Podemos considerar que, en general, existen dos mecanismos de resistencia a los biocidas. Uno, considerado como un mecanismo de “insensibilidad” intrínseco, cuando el desinfectante es incapaz de alcanzar su diana de acción en concentraciones suficientemente elevadas para producir un efecto letal. El otro mecanismo es la resistencia adquirida, ésta puede aparecer como consecuencia de una mutación, o por la adquisición de elementos genéticos externos (plásmidos o transposones) (Hernández, 2006).

Muchos pacientes reciben antimicrobianos. Por medio de selección e intercambio de elementos de resistencia genéticos, los antibióticos promueven el surgimiento de cepas de bacterias polifarmacorresistentes; se reduce la proliferación de microorganismos en la flora humana normal sensibles al medicamento administrado, pero las cepas resistentes persisten y pueden llegar a ser endémicas en el hospital. El uso generalizado de antimicrobianos para tratamiento o profilaxis (incluso de aplicación tópica) es el principal factor determinante de resistencia. En algunos casos, dichos productos son menos eficaces por causa de resistencia. Con la mayor intensificación del uso de un agente antimicrobiano, a la larga surgirán bacterias resistentes a ese producto, que pueden propagarse en el establecimiento de atención de salud. Hoy en día, muchas cepas de neumococos, estafilococos, enterococos y bacilos de la tuberculosis son resistentes a la mayor parte o la totalidad de los antimicrobianos que alguna vez fueron eficaces para combatirlas. En muchos hospitales son prevalentes *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa* polifarmacorresistentes. Este problema reviste importancia crítica particular en los países en desarrollo, donde quizá no se dispone de antibióticos de segunda línea más costosos o, si los hay, su precio es inasequible (Ducel *et al.*, 2002).

II.1.3. Importancia de la desinfección de superficies

La importancia fundamental de la higiene de las manos (desinfección de las manos) en el control de infecciones se ha reconocido desde la época de Ignaz Semmelweis, Florence Nightingale y Robert Koch. Los conocimientos adquiridos a partir de sus obras científicas y prácticas siguen siendo aplicables hoy. En contraste con la higiene de las manos, la relevancia de la desinfección de la superficie o desinfección del medio ambiente se ha mantenido controvertido. Sin embargo, la opinión de que la desinfección del medio ambiente es importante recientemente ha comenzado a ganar terreno (Gebel *et al.*, 2013).

El uso eficaz de los desinfectantes constituye un factor importante en la prevención de las infecciones intrahospitalarias. En 1968, E. H. Spaulding propuso 3 categorías de acción germicida para prevenir el riesgo de infección asociada con el uso de equipos o superficies: no crítica, semicrítico y crítico. Las superficies ambientales se consideran elementos no críticos, ya que entran en contacto con la piel intacta, y la piel intacta es una barrera importante para la adquisición de la enfermedad. El uso de artículos no críticos o el contacto con superficies no críticas conlleva un riesgo bajo de transmisión de un patógeno a los pacientes. Por lo tanto, el uso rutinario de desinfectantes para la desinfección de los suelos del hospital y otras superficies (por ejemplo, mesas de noche o barandillas de la cama) es controvertida. Mientras que las superficies no críticas no se han implicado directamente en la transmisión de la enfermedad, estas superficies potencialmente pueden contribuir a la transmisión cruzada al permitir la adquisición de transporte transitoria de las manos por parte del personal de atención de salud debido al contacto con una superficie contaminada, o por contacto con los pacientes con superficies contaminadas o equipo médico. Las superficies del equipo médico pueden contaminarse con agentes infecciosos y pueden servir como vehículo de brotes de transmisión de persona a persona (Rutala *et al.*, 2004).

Los estudios realizados en los años 1970 y 1980 sugieren que la contaminación superficial del medio ambiente juega un papel insignificante en la transmisión endémica de las infecciones asociadas a la salud. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que varios patógenos nosocomiales importantes se desprenden de los pacientes y contaminan las superficies del hospital en concentraciones suficientes para la transmisión, sobreviven durante largos periodos de tiempo, persisten a pesar de los intentos de desinfectar o eliminarlos, y se pueden transferir a las manos de los trabajadores de la salud. Se está acumulando evidencia de que las superficies contaminadas hacen una contribución importante a la epidemia y la transmisión endémica del *Clostridium difficile*, enterococos resistentes a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y el norovirus, y que la mejora del medio ambiente mediante la desinfección contribuye al control de los brotes. Los esfuerzos para mejorar la higiene ambiental deben incluir la mejora de la eficacia de la limpieza y la desinfección y la reducción de la diseminación de agentes patógenos (Otter *et al.*, 2011).

II.1.4. Bacterias aisladas de superficies ambientales hospitalarias

Los pacientes hospitalizados con frecuencia se limitan a una cama rodeada de múltiples dispositivos, equipos y superficies ambientales que pueden albergar microorganismos. Por lo tanto, existe la preocupación de que el medio ambiente puede jugar un papel en la transmisión de patógenos resistentes a los antimicrobianos entre pacientes. Patógenos resistentes a los antimicrobianos se han aislado a partir de una variedad de fómites, dispositivos y superficies ambientales en la habitación del paciente. Enterococos resistentes a vancomicina (ERV) fueron aislados de las barandas de las camas, sillas de ruedas, oxímetros de pulso, picaportes, mesas, ropa

de cama, batas de pacientes y camas terapéuticas. La contaminación ambiental se ha documentado tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados (Muto *et al.*, 2003).

En un estudio dos (28 %) de siete salas de tratamiento previamente con cultivo negativo en una clínica ambulatoria resultaron ser positivas para ERV después de que un paciente colonizado se observó para la evaluación. Mesas junto a sillas y sillones de tratamiento fueron positivas para ERV en cada habitación en la que se encontró contaminación (Smith *et al.*, 1998).

En un estudio se evaluó el posible papel de las superficies ambientales contaminadas como reservorio de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) en los hospitales, donde se encontró que la contaminación ambiental se produjo en las habitaciones del 73 % de los pacientes infectados y el 69 % de los pacientes colonizados. Los objetos contaminados frecuentes incluyen el suelo, ropa de cama, vestido del paciente, mesas y manguitos de presión arterial; 96 (27%) de 350 superficies en las salas de 38 pacientes colonizados o infectados con MRSA fueron positivos para MRSA (Boyce *et al.*, 1997).

La contaminación ambiental es una fuente potencial de transmisión de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) nosocomiales en una unidad de quemados, encontrándose cepas de MRSA en una ducha de mano y camilla en la sala de hidroterapia (Embil *et al.*, 2001).

Los pisos de las habitaciones individuales utilizados por los pacientes hospitalizados colonizados por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) se limpiaron utilizando mopas secas desechables. Cada fregona se dividió en 12 secciones y MRSA se cuantificó en serie. Este experimento se repitió un total de 21 veces en las habitaciones de cuatro pacientes. La tasa de supervivencia de MRSA en las mopas

secas en comparación con un control fue de 59,0 -125% después de siete días, el 26,3 -41,6 % después de 14 días, 0,1 -16,2 % después de 28 días, 0-0,1 % después de 56 días y 0 % después de 84 días. Llegándose a la conclusión que MRSA diseminada por los pacientes sobre el medio ambiente puede sobrevivir varias semanas en fregonas secas (Oie *et al.*, 2001).

En el servicio de emergencia del Hospital 2 de Mayo se ha encontrado una alta incidencia de *Staphylococcus aureus* además de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* entre otros, tanto a partir del aire como de superficies (Alejo y Buendía, 1992).

Investigando los niveles de contaminación del aire y piso de los servicios de Gineco-Obstetricia en 10 hospitales maternos-infantiles de Lima, se logró detectar *Staphylococcus sp.*, gérmenes gram (-) no fermentadores del grupo de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.* y *Klebsiella sp.* (Ccopa, 1995).

Al evaluar el impacto de una intervención de limpieza en la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) y *Enterococos* resistentes a vancomicina (ERV) en superficies ambientales en las habitaciones de la unidad de cuidados intensivos (UCI), se evidenció la reducción de la probabilidad de un cultivo ambiental positivo para MRSA o ERV. Al incrementar el volumen de desinfectante aplicado a las superficies del entorno de pacientes colonizados y proporcionando educación al personal de servicios ambientales mejoró la limpieza y redujo la frecuencia de contaminación por MRSA y ERV (Goodman *et al.*, 2008).

En una investigación llevada a cabo en el Hospital Central de la Policía-Lima se aisló bacterias ambientales, entre ellas principalmente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*. Evaluándolas frente a 7

desinfectantes se determinó que el hipoclorito de sodio al 5% presentaba un mayor efecto bactericida sobre los estafilococos, mientras que el desinfectante Tego 2000 era el más adecuado para los aislados de *P. aeruginosa* y *E. aerogenes* (Orihuela, 1998). En áreas críticas del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” se aisló del ambiente de la sala de recuperación *Staphylococcus haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii* y *Staphylococcus xylosus*, de la Unidad de Cuidados Intensivos quirúrgicos *Staphylococcus auricularis* y *Staphylococcus xylosus*. También se encontró una contaminación de los desinfectantes principalmente con *Pseudomonas aeruginosa*. Se evaluaron desinfectantes y antisépticos encontrando que la tintura de yodo y el Ydosafe-solución presentaron poder bactericida a cualquiera de las concentraciones ensayadas, el Fageclean era efectivo al 50% de concentración, el jabón líquido era efectivo al 70%, la tintura de timerosal y el Ydosafe-espuma eran efectivos al 80% y el Germibon no presentó efecto bactericida (Abregu y Tapia, 1998).

Las superficies ambientales en las áreas hospitalarias son una fuente de patógenos oportunistas siendo relevante la desinfección de estas superficies y la evaluación de la efectividad de los desinfectantes a utilizar.

II.2. Desinfectantes

Biocida

Es un término general que describe a un agente químico, usualmente de amplio espectro que inactiva microorganismos (Mcdonnell and Russell, 1999).

Antibiótico

El antibiótico se define como una sustancia química derivada de varias especies de microorganismos (bacterias, ascomicetos y hongos) o sintetizado químicamente que tiene la capacidad de actuar selectivamente e inhibir el crecimiento o producir la

destrucción del microorganismo, generalmente a bajas concentraciones (Mcdonnell and Russell, 1999).

Antiséptico

Los antisépticos son biocidas o sustancias químicas que se aplican sobre los tejidos vivos, con la finalidad de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. No tienen actividad selectiva ya que eliminan todo tipo de gérmenes. A altas concentraciones pueden ser tóxicos para los tejidos vivos (GNEAUPP, 2002).

Desinfectante

Los desinfectantes son agentes químicos que se aplican sobre superficies o materiales inertes o inanimados, para destruir los microorganismos y prevenir las infecciones. Los desinfectantes no tienen actividad selectiva. Su elección debe tener en cuenta los posibles patógenos a eliminar. Son tóxicos protoplasmáticos susceptibles de destruir la materia viviente, y no deben ser utilizados sobre tejidos vivos (GNEAUPP, 2002).

Un gran número de desinfectantes se utilizan en el cuidado de la salud. Estos desinfectantes no son intercambiables; cada uno tiene un espectro de uso, ventajas y desventajas. La selección apropiada se debe realizar teniendo en cuenta la seguridad y la eficiencia. Las concentraciones adecuadas, el tiempo de exposición recomendado según los estudios científicos del fabricante, el espectro microbiano, la aprobación de su uso efectuada por organismos oficiales y el adiestramiento del usuario, son algunas de las características que hay que evaluar antes de elegir un desinfectante.

II.2.1. Amonios cuaternarios

Los agentes de superficie activa (surfactantes) tienen dos regiones en sus estructuras moleculares, un hidrocarburo, un grupo repelente al agua (hidrofóbico) y otro grupo de

atracción al agua (hidrofílico o polar). Dependiendo de la base de la carga o ausencia ionización del grupo hidrófilo, los tensioactivos son clasificados en catiónicos, aniónicos, no iónicos, y compuestos anfotéricos (anfótero). De éstos, los agentes catiónicos, se ejemplifica por compuestos de amonio cuaternario (QAC), siendo los QAC a veces conocido como detergentes catiónicos. QAC se han utilizado durante una variedad de propósitos clínicos (por ejemplo, la desinfección preoperatoria de piel intacta, la aplicación a las membranas mucosas, y desinfección de las superficies no críticas). Además de tener propiedades antimicrobianas, los QAC también son excelentes para limpieza de superficies duras y desodorización (McDonnell and Russell, 1999).

Los amonios cuaternarios poseen cinco generaciones de desarrollo:

- Cloruro de Benzalconio (BZK): introducidos en el año 1935, fueron los primeros comercialmente disponibles. Aceptados por su amplio espectro microbiano y su fuerte actividad detergente, tenían algunos inconvenientes: requerían un paso previo de limpieza y, además, los factores comunes del medioambiente como las aguas duras, los residuos aniónicos, los jabones y la suciedad con proteínas los encontraron débilmente efectivos.
- Cuaternarios de segunda generación: introducidos en 1955, ofrecieron efectividad probada en aguas duras y aumentaron su actividad antimicrobiana. Estos desinfectantes fueron de mayor eficacia y mejor tolerados que el BZK.
- Cuaternarios de tercera generación: desarrollados en el año 1965, llamados químicamente de cadenas gemelas, fueron elaborados con detergentes no iónicos, lograron mayor poder limpiador y se convirtieron en mejores desinfectantes. Superan cuatro veces a los anteriores por su acción con aguas duras, y de dos a tres veces, por su acción contra los residuos aniónicos.
- Cuaternarios de cuarta generación: fueron introducidos en la década del 70 y son una combinación de un alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC)

y un cuaternario de cadenas gemelas. Estos cuaternarios resultaron ser menos tóxicos y costosos, y más convenientes, pero demostraron menor actividad germicida que el BZK en un 50%.

- Cuaternarios de quinta generación: unen los de cuarta generación y los cuaternarios de segunda generación. Tienen muy buena acción germicida y son activos bajo las condiciones más hostiles del medioambiente. Además, son fáciles de usar.

Los QAC son agentes tensioactivos anfóteros, que contiene generalmente un nitrógeno cuaternario asociado con al menos un importante sustituyente hidrófobo. Cetrimida USP es tetradeciltrimetilamonio bromuro mientras que el término genérico Cetrimida se refiere a mezclas de *n*-alquiltrimetilo amonio bromuro donde el grupo *n*-alquilo (el resto hidrófobo) es entre ocho y 18 carbonos de longitud. Benzalconio cloruros son siempre mezclas de cloruros de amonio *n*-alquildimetilbencilamonio donde los grupos *n*-alquilo pueden ser de longitud variable dentro de un rango especificado. Además de éstos, diversos haluros de amonio dialkylmethyl y dialkylbenzyl haluros de amonio también tienen actividad antimicrobiana y son diversamente desplegado como biocidas, conservantes y antisépticos (Brannan, 1997).

Las materias primas que proporcionan el grupo alquilo de estos compuestos sintéticos son a menudo aceites naturales tales como aceite de coco o aceite de soja. Estos aceites naturales son mezclas heterógenas de ácidos grasos con longitudes de cadena de carbono entre 6 y 22. Mientras que ácidos grasos de 10, 12, 14 y 16 carbonos dominan, su abundancia relativa varía de un lote a otro. QAC comercialmente disponibles que utilizan aceites naturales como la fuente de los sustituyentes de cadena de alquilo será por lo tanto altamente diversificado no sólo en la longitud de su cadena, sino también en el grado de saturación de C-C. Cada uno de

estos factores afectarán significativamente la actividad antimicrobiana (Gilbert y Moore, 2005).

La actividad de los biocidas de amonio cuaternario es una función parabólica aproximada de la lipofilia de los compuestos (longitud de cadena de n -alquilo). Para las bacterias Gram-positivas y levaduras, tales actividad maximiza con longitudes de cadena de $n=12$ a 14 , mientras que para las bacterias Gram-negativas, se logra una actividad óptima para compuestos con una longitud de cadena de $n=14-16$. Compuestos con longitudes de cadena de n -alquilo de $<n=4$ o $>n=18$ son virtualmente inactivos. Como la actividad antimicrobiana de los QAC hacia las especies de bacterias depende de la hidrofobicidad de la cadena de n -alquilo, entonces, dado que la fuente de material de los sustituyentes n -alquilo es variable, la actividad global de los productos comerciales individuales pueden ser muy variables (Daoud *et al.*, 1983).

La funcionalidad estructural de los compuestos de amonio cuaternario (QAC), especialmente el papel de la longitud de la cadena frente a diferentes bacterias, ha sido observada. Se informó que los QAC con una longitud de la cola hidrofóbica C16 afecta la membrana externa de las bacterias gram-negativas más ampliamente que los compuestos de cadena más corta, posiblemente debido a que la cadena C16 interactúa fuertemente con la porción de ácido graso del lípido A (Ahlfström *et al.*, 1999). Sin embargo muchas mezclas de amonio cuaternario se mezclan para optimizar las actividades en contra de grupos específicos de bacterias, o para obtener un espectro de actividad lo más amplio como sea posible.

El modo de acción de los compuestos de amonio cuaternario (QAC) contra las células bacterianas es una perturbación general de la bicapa lipídica, tanto las membranas que constituyen la membrana citoplasmática bacteriana y la membrana externa de

bacterias Gram-negativas. Esta acción lleva a una generalizada y progresiva fuga de materiales citoplasmáticos hacia el medio ambiente (Gilbert y Moore, 2005)

A nivel molecular, la acción implica una asociación del nitrógeno cuaternario cargado positivamente con los grupos de cabeza de fosfolípidos ácidos dentro de la membrana. La cola hidrófoba entonces interdigita en el núcleo hidrófobo de la membrana. Por lo tanto, a baja concentración (aproximadamente concentraciones mínima inhibidora del crecimiento, MIC) la interacción aumenta la presión superficial en la parte expuesta de la membrana para disminuir la fluidez de la membrana y de la temperatura de transición de fase. La membrana se somete a una transición de líquido a estado cristalino líquido y pierde muchas de sus funciones fisiológicas y osmoregulatoria. El núcleo de la membrana disminuye en la hidrofobicidad y los fosfolípidos tienden hacia una disposición hexagonal estable. En concentraciones de uso, las soluciones de QAC forman agregados micelares mixtas que solubilizan componentes hidrófobos de la membrana (Gilbert y Moore, 2005).

Bajas concentraciones de QAC se unen firmemente a los sitios aniónicos encontrados en la superficie de la membrana bacteriana, haciendo que las células pierdan su capacidad osmoregulatoria y causa fugas de iones de potasio y protones (Lambert y Hammond, 1973). Los niveles intermedios perturban fisiologías situadas en la membrana como la respiración, biosíntesis de la pared y el transporte celular de solutos (Sal y Wiseman 1970). Las altas concentraciones utilizadas en las formulaciones biocidas matan las células mediante solubilización de las membranas para liberar todo el contenido de células, de ahí su designación como detergentes biológicos (Salton, 1951).

Un estudio realizado en el Reino Unido evaluó los desinfectantes de amonio cuaternario alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC) y didecyl dimethyl

ammonium chloride (DDAC) llegando a la conclusión de que tanto ADBAC y DDAC interactúan con la membrana citoplasmática de *Staphylococcus aureus*, la inducción de la fuga inmediata de los componentes intracelulares, confirmando la lesión primaria para ambos. En el intervalo de concentraciones estudiadas DDAC fue ligeramente más potente que el ADBAC, pero no hubo diferencias sobresalientes en sus propiedades (Ioannou *et al.*, 2007).

En un estudio se investigó los cambios fisiológicos inducidos por el amonio cuaternario cloruro bencildimetildodecilamonio en *Pseudomonas fluorescens*, llegándose a la conclusión que es un biocida eficaz. Se une por interacciones iónicas e hidrófobas a la membrana celular, provocando cambios en las propiedades de la membrana y la función, tal como se manifiesta por fenómenos como la ruptura celular y la pérdida de integridad de la membrana con la consiguiente fuga de constituyentes intracelulares (Ferreira *et al.*, 2011).

II.2.2. Hipoclorito de sodio

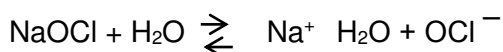
Soluciones de hipoclorito de sodio se utilizan ampliamente para la desinfección de superficies duras (lejía doméstica) y puede ser utilizado para la desinfección de los derrames de sangre que contienen el virus de la inmunodeficiencia humana o virus de la hepatitis B (HBV) (McDonnell and Russell, 1999).

Los compuestos de cloro se utilizan comúnmente como agentes desinfectantes en la industria alimentaria debido a su alta eficacia antimicrobiana, baja toxicidad para los seres humanos, gama de aplicaciones y de bajo costo, pero sufren las desventajas de ser irritante y corrosivo. Los organoclorados son menos irritantes y corrosivos que cloros inorgánicos y tienen una mayor estabilidad, pero son de acción más lenta en términos de eficacia bactericida (Khanna y Naidu, 2000).

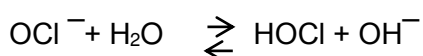
Todas las soluciones de agentes liberadores de cloro que contiene cloro libre tienen un amplio espectro antimicrobiano que incluye bacterias vegetativas, micobacterias, esporas bacterianas, virus, algas y protozoos. Una revisión de varios estudios de la acción antibacteriana de cloro libre disponible indica que las concentraciones de 0,05 a 5,0 ppm producirán muerte de una gama de bacterias vegetativas dentro de 15 s a 5 minutos, mientras que para *Mycobacterium tuberculosis*, una concentración de 50 ppm Se requiere con 30 s de contacto (Bloomfield, 1996).

El hipoclorito de sodio es un agente liberador de cloro (CRA) así como compuestos de dióxido de cloro, y los N-cloro tales como dicloroisocianurato de sodio (NaDCC). En el agua el hipoclorito de sodio se ioniza para producir Na^+ y el ion hipoclorito, OCl^- , que establece un equilibrio con el ácido hipocloroso, HOCl (Bloomfield, 1996). Entre pH 4 y 7, el cloro existe predominantemente como HOCl , la fracción activa, mientras que por encima de pH 9, predomina OCl^- .

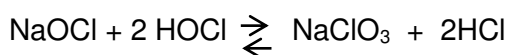
Hipocloritos (sodio y calcio) son los compuestos de cloro más antiguos y más ampliamente utilizados en el campo de la desinfección química. Hipocloritos de sodio, en lugar de hipoclorito de calcio, ahora se utiliza principalmente y está disponible comercialmente en solución a concentraciones que varían de 1 a 14% (w / v) de cloro disponible. Hipoclorito de sodio (NaOCl), cuando se disuelve en agua, se ioniza según la ecuación:



NaOCl es una sal de un ácido débil, los iones hipoclorito establecen un equilibrio con HOCl , la concentración del ión hipoclorito aumenta con el aumento de pH:



Las soluciones de hipoclorito de sodio, por lo tanto, son alcalinas, el pH de la solución depende de la concentración de iones hipoclorito presentes. Las soluciones de NaOCl son relativamente inestables en descomposición para dar clorato de sodio y ácido clorhídrico:



La exposición a la luz provoca la ruptura de hipoclorito, produciendo clorito (ClO_2) y oxígeno; en consecuencia, las soluciones deben almacenarse en contenedores oscuros. Iones de metales pesados causan la descomposición catalítica de hipocloritos, producción de cloruro y oxígeno (Bloomfield, 1996).

La evidencia experimental indica que la acción bactericida de los agentes liberadores de cloro resulta de la interacción oxidativas con grupos sulfhidrilo de las enzimas clave dentro de la membrana de la célula o protoplasto de célula. Antibacterianos liberadores de cloro se caracterizan por su extrema reactividad como agentes oxidantes, y el poder germicida rápida de cloro es, sin duda debido a su alta reactividad oxidante, por el cual se destruye la actividad de las proteínas celulares.

Dos factores pueden afectar muy notablemente su acción antimicrobiana la materia orgánica, ya que el cloro es un producto químico altamente reactivo, y el pH, los hipocloritos son más activos en pH ácido que en pH alcalino (Khanna y Naidu, 2000).

Los primeros investigadores sugirieron que en soluciones de agentes liberadores de cloro el ácido hipocloroso es la especie activa que es responsable de la destrucción de los microorganismos. Esta hipótesis se basa en observaciones que muestran que la actividad de los agentes liberadores de cloro se incrementa a un pH ácido en el que el ácido hipocloroso está casi exclusivamente en su forma no disociada (Bloomfield, 1996).

La interacción de los agentes liberadores de cloro con células bacterianas intactas es extremadamente complejo, ya que la interacción es generalmente no selectiva, de tal manera que la interacción total con una masa célula dada se compone no sólo de cantidades relativas de cloro responsables de lesiones primarias y secundarias que causan la muerte celular, sino también las cantidades utilizadas en otras reacciones no bactericidas que consumen cloro disponible.

Igualmente importante es que el grado de interacción con las estructuras intracelulares también será determinado por la penetración de las capas exteriores de células a los sitios de acción sobre o dentro de la célula. Como se dijo anteriormente, que los agentes liberadores de cloro son más eficaces a un pH ácido se cree que es debido a la potenciación de la oxidación, pero también puede ser debido al hecho de que los agentes liberadores de cloro no ionizados penetran más fácilmente en las capas exteriores de las células (Bloomfield, 1996).

II.3. Evaluación de desinfectantes

El primer artículo sobre las pruebas de los desinfectantes se escribió por Robert Koch y apareció en 1881, se titulaba über Desinfektion (sobre la desinfección). Describió el siguiente método de prueba: Un hilo de seda se contamina por inmersión en un cultivo líquido del organismo de prueba *Bacillus anthracis*; después del secado, este hilo contaminado se sumerge en la solución desinfectante durante un tiempo de exposición dado; a partir de entonces el hilo se cultiva en un caldo nutriente; ningún crecimiento después de la incubación indica que el producto es activo. Dicha prueba se considera ahora como una prueba de portador. Koch comparó varias sustancias químicas; se encontró con que, para la misma concentración del principio activo de la sustancia, cloruro de mercurio era el producto más activo. Era, sin embargo, un resultado

erróneo: hubo un arrastre de los residuos del desinfectante en el subcultivo del medio, de modo que la acción bacteriostática del cloruro de mercurio continuó actuando: se indicó erróneamente que no había supervivencia. El problema ahora está resuelto por la neutralización del desinfectante al final de la exposición (Reybrouck, 2007).

Una de las innovaciones más ingeniosas en la prueba de desinfectantes por medio de una prueba de suspensión fue la introducción de una preparación estándar, fenol, en 1903 por Rideal y Walker. En sus resultados cualitativos de prueba (crecimiento o no crecimiento) del desinfectante probado para varios tiempos de exposición se comparan con los de una dilución activa de fenol que se prueba en el mismo experimento. La relación de la dilución activa del desinfectante a ésta de fenol es el llamado coeficiente de fenol. La determinación del coeficiente de fenol se mantuvo como la prueba estándar durante más de medio siglo, siempre y cuando la mayoría de los desinfectantes fueran compuestos fenólicos (Rideal y Walker, 1903).

El último tipo de pruebas a ser aplicados en la evaluación de desinfectantes de superficies fue la prueba de capacidad. Cada vez que un trapeador se empapa en un balde con solución desinfectante, una cierta cantidad de suciedad y de bacterias se añade a esta solución, lo que disminuye la actividad de la solución. La capacidad de retener la actividad en presencia de una creciente carga de materia orgánica y de bacterias es la capacidad del desinfectante. Así se introdujo el principio de la capacidad en los ensayos las pruebas de desinfectantes de superficies en el años sesenta del siglo pasado (Kelsey *et al.*, 1965).

Un paso más en la normalización de la prueba de desinfectantes fue la introducción de pruebas cuantitativas después de la Segunda Guerra Mundial. A partir del estudio de la cinética de la desinfección, estaba claro que el punto final de ningún crecimiento, o ningún organismo sobreviviente, se determina por el tamaño del inóculo, a saber, el

número de organismos presentes en la suspensión bacteriana o en el soporte y que entra en contacto con el desinfectante (Reybrouck, 2007).

En 1970 se fundó un grupo de trabajo científico patrocinado por el Rudolf Schülke Stiftung: Coloquio Internacional para la Evaluación de desinfectantes en Europa. Consistía en grupos de científicos de Alemania, Austria, Bélgica, (Oeste-) Alemania, los Países Bajos, Suecia, Suiza y el Reino Unido. El objetivo era desarrollar un consenso general sobre los requisitos de todo tipo de desinfectantes procedimientos y métodos que deben seguirse en la evaluación de su actividad microbicida. A medida que la unificación de las pruebas de desinfección era una prioridad para la industria europea, la inglesa, la francesa, la alemana y el instituto estándar suizo pidieron al CEN (Comité Europeo de Normalización) desarrollar normas europeas. En abril de 1990 comenzó el CEN un nuevo comité técnico TC 216, llamada química desinfectantes y antisépticos, con el alcance: la estandarización de la terminología, requisitos, métodos de ensayo incluyendo la eficacia potencial en condiciones de uso, las recomendaciones para el uso y el etiquetado en todo el campo de la desinfección química y antisepsia; áreas de actividad incluyen la agricultura, servicio doméstico, higiene de los alimentos y otros campos industriales, aplicaciones institucionales, médicos y veterinarios (Reybrouck, 2007).

La evaluación antimicrobiana de los biocidas incluye cuatro etapas fundamentales. La primera etapa consiste en determinar la actividad antimicrobiana básica del producto, mediante ensayos in vitro, enfrentando suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. Posteriormente en una segunda etapa, se ha de determinar si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones que se pueden encontrar en la práctica de la desinfección para un determinado uso (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material y la práctica clínica). En una tercera etapa se evalúa la actividad del desinfectante mediante un método experimental con el equipo clínico que va a ser utilizado, contaminándolo artificialmente y estudiando la

reducción del número de microorganismos por la acción del desinfectante. En una última fase (cuarta etapa), el desinfectante se evalúa en la práctica clínica, mediante estudios de campo en los que se controla el resultado de la desinfección. Actualmente, se dispone de algunos métodos oficiales para las dos primeras etapas. Sin embargo, en las dos últimas etapas la estandarización no ha podido aún ser consensuadas (Hernández, 2006).

Clasificación del CEN/TC 216 (Hernández, 2006).

_ Fase 1: Ensayos para determinar actividad antimicrobiana: Ensayos de suspensión básicos

_ Fase 2/ etapa 1: Ensayos para determinar la actividad antimicrobiana específica para una determinada aplicación: Ensayos de suspensión amplificados

_ Fase 2/ etapa 2: Ensayos para determinar la actividad antimicrobiana en condiciones similares a la práctica (lavado de manos, frotación de manos y desinfección de superficies)

_ Fase 3: Ensayos de campo (ensayos “en uso”)

Ensayos de suspensión

El esquema básico de los ensayos de suspensión, consiste en mezclar un determinado inóculo microbiano con una determinada dilución de desinfectante y después de un tiempo de contacto, transferir alícuotas de la mezcla microorganismos-desinfectante a un medio que contenga el neutralizante del desinfectante. Estos ensayos pueden ser cualitativos (cuando se detecta presencia o ausencia de microorganismos supervivientes en los subcultivos) o cuantitativos (cuando se realiza el recuento del número de microorganismos supervivientes con respecto al inóculo inicial). Los ensayos cualitativos fueron muy utilizados en el pasado, pero actualmente se prefieren los ensayos cuantitativos porque dan una información de mayor utilidad. Mediante estos ensayos se puede determinar la reducción del inóculo inicial

conseguida por el desinfectante en una determinada dilución y en un determinado tiempo de contacto. Estos ensayos pueden realizarse con varias concentraciones del desinfectante y con distintos tiempos de contacto, en presencia o ausencia de materia orgánica y con diferente dureza del agua. Todos estos factores influirán en los resultados (Hernández, 2006).

La recuperación de los microorganismos puede realizarse por cultivo directo en un medio sólido o por filtración sobre membrana. El recuento por cultivo directo (cultivo en masa o en superficie) es el utilizado habitualmente y resulta menos engorroso, pero requiere la neutralización del desinfectante y por tanto ensayos previos para determinar cuál es el neutralizante ideal para cada caso; son los denominados ensayos de dilución-neutralización. Cuando no se halla un neutralizante adecuado para el desinfectante, se puede recurrir a la técnica de filtración sobre membrana para el recuento de microorganismos viables (Hernández, 2006).

El número de microorganismos supervivientes en los subcultivos se compara con el número de microorganismos presentes en un control en el que el desinfectante se sustituye por agua destilada estéril u otro tipo de diluyente. La tasa de reducción logarítmica o efecto biocida es la diferencia entre el logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonias (ufc) recuperadas en el control y el número de ufc recuperada después de la exposición con el desinfectante. El ensayo básico de actividad bactericida europeo del CEN 20 requiere una reducción de 5 log₁₀ en 5 minutos de contacto a 20° (AENOR, 2006).

II.4. Neutralizante

La actividad residual de un biocida químico puede inhibir el crecimiento de los microorganismos en el medio de recuperación, sobrestimando la destrucción de microorganismos por parte del producto biocida y potenciando resultados falsos

negativos. Por ello, es necesario establecer una adecuada neutralización para que los resultados obtenidos en los ensayos sean realmente los de la actividad biocida. La inactivación química de los biocidas es el método más empleado de neutralización. En la tabla 1 se indican los neutralizantes más comunes para algunos biocidas. (Hernández, 2006).

Tabla 1. Neutralizantes de uso más frecuente (Hernández, 2006)

Desinfectante	Neutralizante
Fenoles	1% de polisorbato 80, 3% de saponina, 0.3% de lecitina en PBS
Aldehídos	3% de polisorbato 80, 0.3% de lecitina 0.1% L-histidina. Glicina Yema de huevo fresca diluida al 5 o al 0.5% Yema de huevo fresca diluida al 5% y polisorbato 80, 40 g/l. Lecitina al 4%.
QAC	0.3% de lecitina y 3% de polisorbato 80. Emulsión comercial de fosfolípidos (50mg/ ml), diluida al 1/10
Compuestos órganomercuriales	Tioglicolato sódico al 0.5 o 5 g/l L-cisteína al 0.8 o 0.15 g/l
Peróxidos	Catalasa
Otros	Tiosulfato sódico 5 g/l PBS, 0.25 M Polisorbato 80 30g/l, saponina 30 g/ñ, L-histidina 1 g/ l y L-cisteína 1 g/ l

En la composición de los neutralizantes se pueden utilizar detergentes no iónicos como el polisorbato 80 (Tween 80), solo o en combinación con lecitina para inactivar los QACs, clorhexidina y compuestos fenólicos. No obstante, el polisorbato puede alterar la permeabilidad de la membrana y hacer que los microorganismos sean más sensibles a los cambios de pH, temperatura y concentraciones de biocida incrementando el efecto antimicrobiano del biocida. En muchos casos los

neutralizantes son tóxicos para ciertas especies, y la eficacia de los biocidas es variable según el tipo de microorganismo, y esto requiere diferentes niveles o grados de neutralización (Hernández, 2006).

Es esencial incluir controles en los ensayos de actividad biocida cuando se utiliza un método de neutralización para eliminar los restos de biocida. De no realizarse estos controles se podrían dar resultados falsos negativos causados por la actividad microbio estática o microbicida del neutralizante. La eficacia o capacidad del neutralizante para inhibir la acción del biocida sobre los microorganismos, puede demostrarse comparando el número de microorganismos recuperados a partir del neutralizante en presencia y ausencia del biocida. Esta comparación evita confundir el efecto tóxico del neutralizante con una inadecuada inhibición del producto biocida.

La toxicidad puede estimarse comparando los microorganismos recuperados a partir de dos poblaciones, como se ha comentado en el caso de la eficacia del neutralizante. El primer tratamiento consistirá en mezclar el neutralizante con tampón salino y el segundo en hacerlo entre el neutralizante y el producto biocida. Ambas mezclas de productos se inoculan con un número de microorganismos reducido, del orden de 100 ufc/ml, y a continuación se calculará el número de supervivientes. Si el neutralizante es efectivo y no tóxico, los dos grupos de tratamiento tendrán idéntico o parecido número de microorganismos viables (Sutton, 1996)

II.4.-Antecedentes

En la universidad de Murcia se llevó a cabo un estudio sobre la efectividad de desinfectantes de amonio cuaternario, ácido paracético y yodo tensioactivo frente a cepas aisladas de superficie. Llegando a la conclusión que es recomendable el estudio previo de la microflora que se encuentra en la superficie que se requiere

limpiar, tomando como referencia para medir la efectividad de los desinfectantes la concentración mínima bactericida (Taboada *et al.*, 2007).

En una investigación llevada a cabo en el Hospital Central de la Policía-Lima se aisló bacterias ambientales, entre ellas principalmente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*. Evaluándolas frente a 7 desinfectantes se determinó que el hipoclorito de sodio al 5% presentaba un mayor efecto bactericida sobre los estafilococos, mientras que el desinfectante Tego 2000 era el más adecuado para los aislados de *P. aeruginosa* y *E. aerogenes* (Orihuela, 1998).

En áreas críticas del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” se aisló del ambiente de la sala de recuperación *Staphylococcus haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii* y *Staphylococcus xylosus*, de la Unidad de Cuidados Intensivos quirúrgicos *Staphylococcus auricularis* y *Staphylococcus xylosus*. También se encontró una contaminación de los desinfectantes principalmente con *Pseudomonas aeruginosa*. Se evaluaron desinfectantes y antisépticos encontrando que la tintura de yodo y el Ydosafe-solución presentaron poder bactericida a cualquiera de las concentraciones ensayadas, el Fageclean era efectivo al 50% de concentración, el jabón líquido era efectivo al 70%, la tintura de timerosal y el Ydosafe-espuma eran efectivos al 80% y el Germibon no presentó efecto bactericida (Abregu y Tapia, 1998).

En una evaluación de desinfectantes mediante el método de Kelsey-Sykes modificado, utilizando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró que la asociación glutaraldehído-formaldehído era la de mejor acción, seguido de la iodopovidona al 10% y un derivado de amonio cuaternario al 10%, siendo el de menor acción el glutaraldehído al 2% (Romero, 2000).

Dado que los patógenos y oportunistas del ambiente hospitalario varían de un hospital a otro y de un área a otra y que la susceptibilidad a los desinfectantes de los patógenos y oportunistas del ambiente hospitalario varían de un hospital a otro, es necesario determinar todo esto en estudios previos. Además la aplicación de desinfectantes si bien está normada por el Ministerio de Salud, en la resolución ministerial N° 372-2011 (Perú, 2011), donde indica que la aplicación de los desinfectantes se llevará a cabo según las especificaciones del fabricante, esto debe adecuarse a las condiciones de cada nosocomio.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. HIPÓTESIS:

Existen bacterias patógenas y oportunistas en los ambientes del área quirúrgica hospitalaria, con distintas sensibilidades a los desinfectantes, por lo que la eficiencia de éstos es variable.

III.2. OBJETIVOS:

III.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad bactericida de tres desinfectantes de uso clínico frente a cepas bacterianas ATCC y cepas aisladas de las superficies de áreas quirúrgicas hospitalarias.

III.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar las bacterias ambientales patógenas y oportunistas del área quirúrgica de dos clínicas de Lima.
- Determinar las concentraciones adecuadas de neutralizantes para cada uno de los desinfectantes a usar.
- Establecer la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de cada desinfectante frente a las cepas ATCC y aquellas aisladas de las superficies de áreas quirúrgicas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MATERIALES

IV.1.1. Material biológico

Se utilizó como cepas patrones: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y los aislados ambientales del área de quirófano de dos clínicas de Lima.

IV.2. MÉTODOS

IV.2.1. Toma de muestra

Para el aislamiento de las bacterias patógenas y oportunistas se tomaron muestras de la zona limpia, específicamente de la sala de operaciones y del área de lavado, del área quirúrgica de 2 clínicas de Lima. Las muestras fueron tomadas antes y después del proceso de limpieza y desinfección del área quirúrgica. Las muestras tomadas antes del proceso de limpieza y desinfección permitieron aislar las bacterias presentes en el ambiente y así conocer la flora presente en las áreas quirúrgicas de las clínicas. Las muestras tomadas después del proceso de limpieza y desinfección permitieron aislar las bacterias, posiblemente resistentes al tratamiento con desinfectantes. La toma de muestra fue realizada en tres oportunidades, en fechas diferentes para cada clínica, se realizaron 110 hisopados para cada clínica.

Las muestras de superficie fueron tomadas como sigue: piso, pared, equipos, mesas, camilla y pileta del área de lavado. La metodología de toma de muestra fue según García (2010) mediante el método de hisopado, empleando hisopos de algodón estériles embebidos en 5 mL de solución salina fisiológica estéril, éste se retiró del tubo quitando el exceso de solución salina presionando el hisopo contra la parte interna del tubo, utilizándose plantillas de cartulina estériles para delimitar el área a hisopar (200cm²). Se realizaron frotices en la zona delimitada con los hisopos en 4 diferentes sentidos e inmediatamente fueron colocados en tubos con 5 mL de caldo

trípticasa soya, rompiendo la parte superior del hisopo, que entró en contacto con el guante, contra la parte interior del tubo.

Luego de una incubación a 37 °C por 24 horas, cada tubo se sembró por estriado en Agar Sangre, Agar Cetrimide, Agar Manitol Salado y Agar Mac Conkey para ser incubados a 37 °C por 48 horas.

Las cepas fueron caracterizadas culturalmente en los diferentes medios y pasadas a cepario para su identificación.

IV.2.2. Identificación de bacterias aisladas

Las cepas bacterianas ambientales fueron identificadas en base a las recomendaciones del Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias (Instituto Nacional de Salud, 2005) y con la utilización del API 20E.

a) Se realizaron pruebas básicas de tinción Gram, oxidasa, catalasa y morfología celular.

b) Pruebas bioquímicas y fisiológicas para identificación genérica y/o específica:

b.1) Para cocos Gram positivos: hemólisis en Agar Sangre, prueba de Oxidación-Fermentación, prueba de la coagulasa y prueba de bilis esculina.

b.2) Para bacilos Gram negativos, oxidasa-negativas: utilización del API 20E

b.3) Para bacilos Gram negativos, oxidasa-positivas: prueba de Oxido-Fermentación de glucosa, prueba de utilización de citrato, prueba de hidrólisis de la gelatina, prueba de reducción de nitrato a nitritos, crecimiento a 42 °C, Agar Triple Azúcar Fierro (TSI) y producción de pigmentos.

b.4) Bacilos Gram positivos, formadores de endosporas y catalasa positivos son considerados del genero *Bacillus* sp. de acuerdo al Manual de determinación bacteriológica Bergey's (Garrrity. *et al.*, 2012).

IV.2.3. Actividad bactericida de los desinfectantes

La actividad bactericida se evaluó determinando la Concentración Mínima Bactericida (CMB), según Álvarez *et al.*, (2001) esta es la concentración o dilución del desinfectante ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas una suspensión de bacterias. Se utilizaron las condiciones obligatorias de ensayo de la norma española UNE-EN 1040:2006 de 5 minutos \pm 10 segundos de contacto con el desinfectante a 20 ± 1 °C , utilizando el método dilución /neutralización (AENOR, 2006).

IV.2.3.1. Preparación de suspensiones bacterianas a partir de cepas ATCC y cepas aisladas de superficie identificadas

A las cepas utilizadas se les dieron 3 pasajes consecutivos sembrándolas en la superficie de un tubo de Trípticasa Soya Agar (TSA) inclinado y se incubaron a 37 °C de 18-24 horas.

Luego se arrastró el crecimiento con el asa el cultivo, poniéndolo en un tubo con 10 ml de solución fisiológica estéril y agitándolo con el vortex aproximadamente 20 segundos para obtener una suspensión bacteriana homogénea. Se ajustó las suspensiones bacterianas de las cepas Gram positivas a 1,5 en la escala de Mc Farland y de las cepas Gram negativas a 0,8 en la escala de Mc Farland utilizando el densitómetro. Llevando así las suspensiones de ensayo ajustadas a una concentración de $1-3 \times 10^8$ ufc/ml. A partir de estas suspensiones bacterianas de ensayo, utilizando solución salina fisiológica y tubos estériles, se prepararon diluciones seriadas como sigue en la tabla 2.

Tabla 2 Dilución de las suspensiones bacterianas (Álvarez *et al.*, 2001).

Nº de tubo	1	2	3	4	5	6
Dilución	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/50000	1/1000000
Suspensión bacteriana en diluyente (ml)	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,4 en 3,6	0,8 en 3,2	0,2 en 3,8
Concentración bacteriana (bacterias/ml)				$1-3 \times 10^4$	$2-6 \times 10^3$	$1-3 \times 10^2$

Se tomó 1 ml de la dilución nº 6 ($1-3 \times 10^2$ bacterias/ml), y se sembró por el método de incorporación, en una placa petri, esto se realizó por duplicado, y se incubó por 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se hizo el recuento de colonias en las placas, y se obtuvo el valor promedio de las dos placas (R), este es el inóculo (Álvarez *et al.*, 2001).

IV.2.3.2. Ensayo de neutralización

Para la evaluación adecuada de la acción bactericida, en el tiempo, de los desinfectantes es necesario anular su efecto, una forma es la utilización de agentes químicos neutralizantes los cuales se deben determinar para cada desinfectante y cepa bacteriana a utilizar en el ensayo de los desinfectantes. La neutralización de la actividad bactericida de los desinfectantes solamente se ensaya para la concentración más alta usada en el ensayo del desinfectante. Los neutralizantes a evaluar para Green Desinfectant, y Forward, dado que los principios activos presentes en los dos son derivados de amonio cuaternario, son:

- Polisorbato 80 (Tween 80) 2% y Lecitina 2,5% (Mamani, 2008)
- Polisorbato 80 (Tween 80) 5% y Lecitina 1,5% (Tote *et al.*, 2010)

Los neutralizantes a evaluar para el hipoclorito de sodio son:

- Tiosulfato de sodio 0,5% (Tote *et al.*, 2010)
- Tiosulfato de sodio 0,8% (Mamani, 2008)
- Tiosulfato de sodio 1,0%

Para cada neutralizante y/o cepa bacteriana se prepararon 2 tubos que contienen cada uno:

Tubo A: 1 ml de agua destilada estéril.

Tubo B: 1 ml de desinfectante a concentración 1/5 de la máxima de ensayo.

Se añadió en cada uno de los tubos anteriores 1 ml de neutralizante a doble concentración. Se Agitó y se mantuvo durante 10 minutos \pm 10 segundos a 20 ± 1 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió en cada tubo 0,1 ml de la dilución bacteriana nº 5 ($2-6 \times 10^3$ bacterias/ml). Se agitó y mantuvo durante 5 minutos \pm 10 segundos a 20 ± 1 °C. A continuación, se tomó de cada tubo dos alícuotas de 1 ml y procedió al recuento en placa, como se ha descrito anteriormente (se obtienen 2 placas del tubo A y 2 placas del tubo B). Se incubó 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento de colonias en las placas (ANEXO 01A). Se obtiene el valor medio de las dos placas controles en las que se adicionó agua destilada (C), y el valor medio de las dos placas con desinfectante (n). Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50 % de las células bacterianas sean protegidas. Para que un neutralizante sea adecuado debe cumplir con el criterio de validez: $R \cong C; n \geq 0,5 C$ (Álvarez *et al.*, 2001). La diferencia de C respecto a R debe de ser menor al 10%.

R: Promedio de las dos placa del recuento de las suspensiones bacterianas.

C: Promedio de las dos placas sembradas del tubo A.

n: Promedio de las dos placas sembradas del tubo B.

IV.2.3.3. Ensayo para determinar la CMB de los desinfectantes

Según el fabricante, las diluciones de los desinfectantes a usar en zonas críticas hospitalarias para Green Desinfectante es 1/60 y para Forward es 1/10 y, según Resolución Ministerial N° 1472-2002 del Ministerio de Salud (Perú, 2002) en zonas críticas, el Hipoclorito de Sodio se usa al 0,1%. Se usó diluciones sucesivas con factor 2 partiendo de la dilución en uso indicado por el fabricante, para los dos desinfectantes de amonio cuaternario, hasta encontrar la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Las diluciones usadas para cada desinfectante son:

GREEN DESINFECTANT: 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960 y 1/1920

FORWARD: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320

Hipoclorito de sodio: 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 y 0,005% (v/v)

Se preparó las soluciones de desinfectante a concentración C/0,9 de la que se quiere ensayar (ya que se añaden 9 ml de solución de desinfectante y 1 ml de suspensión bacteriana). Las diluciones se realizaron con agua destilada estéril (Álvarez *et. al.*, 2001).

Se prepararon tubos con 2,25 ml de neutralizante a concentración simple y tubos con 0,9 ml para cada dilución de los desinfectantes. Se añadió 0,1 ml de la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) a cada tubo de desinfectante. Se agitó y mantuvo durante 5 minutos \pm 10 segundos a 20 ± 1 °C. Transcurrido este tiempo se tomó 0,25 ml de cada tubo y se añadió a un tubo con neutralizante (2,25 ml a concentración simple). Se agitó y se mantuvo durante 10 minutos a 20 °C. A continuación, se tomó de cada uno de estos tubos dos alícuotas de 1 ml y se procedió al recuento en placa (se obtuvo 2 placas por cada concentración de desinfectante utilizada). Se incubaron 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizó el

recuento de colonias en las placas (ANEXO 01B). Se obtuvo el valor promedio de las dos placas de cada concentración de desinfectante (d). Para que una concentración de desinfectante sea bactericida se tiene que producir una reducción de 10^5 en el número de células bacterianas, es decir, $d \leq (C/10)$

La reducción logarítmica se calcula de la siguiente forma: $\log (C \times 10^4) - \log d$ (Álvarez *et. al.*, 2001).

V.-RESULTADOS

V.1. Bacterias aisladas de las superficies

De las superficies ambientales en las áreas quirúrgicas se aisló 6 especies bacterianas en la clínica A y 3 especies bacterianas en la clínica B, de las cuales la bacteria más aislada en la clínica A fue *Bacillus* sp. con 13 cepas y el grupo bacteriano más aislado de la clínica B fue *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) con 21 cepas, la figura 1 muestra una cepa de SCN aislada de la clínica B.

En la clínica A el piso es la superficie con mayor aislamiento de cepas bacterianas, 12 bacterias, y la superficie con mayor variedad de especies bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* además de *Bacillus* sp. En la clínica B la mesa es la superficie con mayor aislamiento de cepas bacterianas, siendo 11 el número.

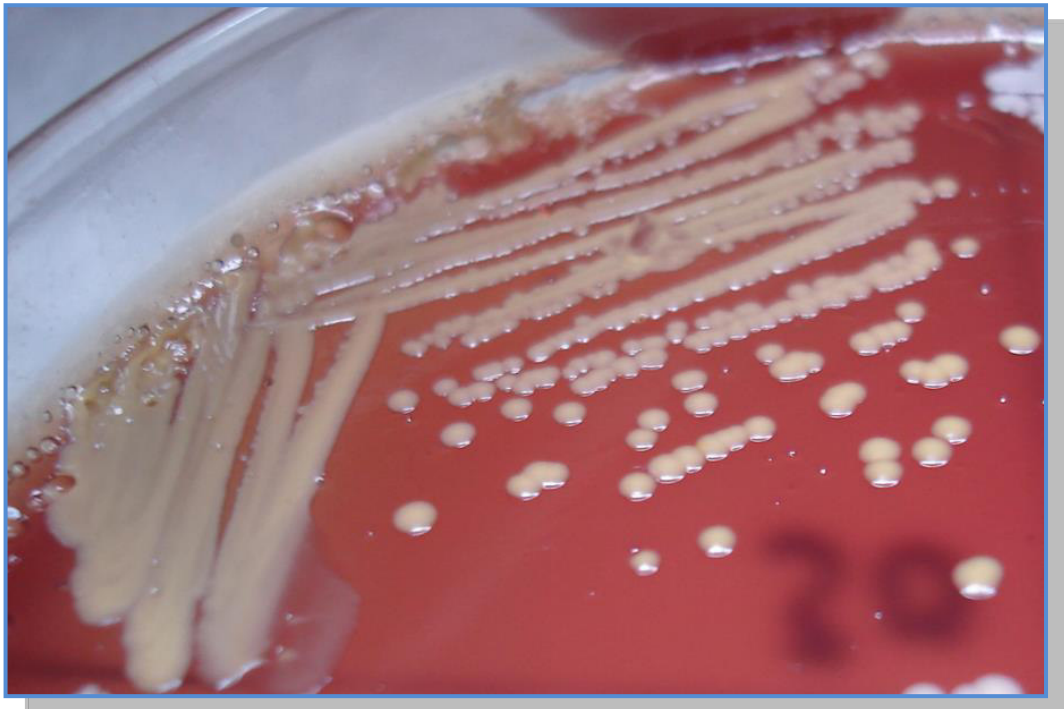


Figura 1. Colonias de la Cepa 40 aislada en agar sangre e identificada como SCN, aislada de una mesa del área quirúrgica de la clínica B.

Las especies bacterianas aisladas de las superficies ambientales de la clínica A están en la Figura 2. Y las especies bacterianas aisladas de las superficies ambientales de la clínica B están en la Figura 3.

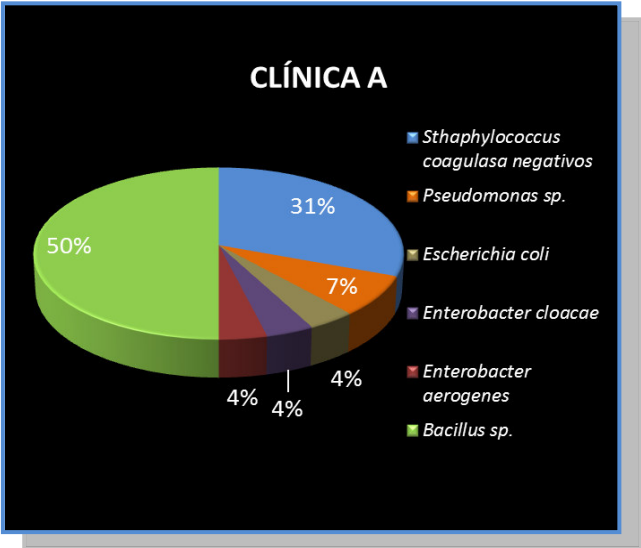


Figura 2. Porcentaje de las especies bacterianas aisladas de la clínica A

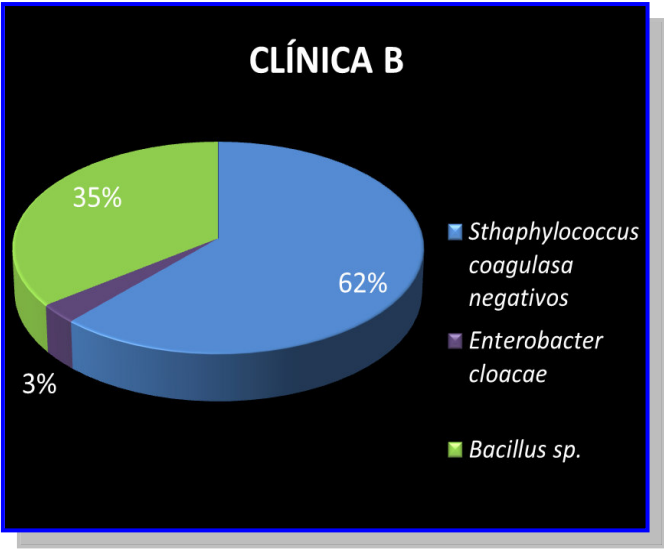


Figura 3. Porcentaje de las especies bacterianas aisladas de la clínica B

Tabla 3. Número de especies bacterias aisladas según clínica y superficie muestreada

Superficies	Clínica A							Clínica B			
	SCN	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Total	SCN	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. cloacae</i>	Total
Piso	-	-	1	1	1	9	12	6	-	-	6
Mesa	3	-	-	-	-	-	3	8	3	-	11
Pared	1	-	-	-	-	3	4	1	3	-	4
Equipo	3	2	-	-	-	-	5	3	-	1	4
Lavadero	-	-	-	-	-	1	1	2	4	-	6
Camilla	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	3
Soporte de trapos	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Total (%)	8(31%)	2(7%)	1(4%)	1(4%)	1(4%)	13(50%)	26	21(62%)	12(35%)	1(3%)	34

Las especies bacterianas aisladas en el área de quirófano de la clínica A antes de la desinfección están en la Tabla 4 y la Figura 4, las especies bacterianas aisladas después de la desinfección están en la Tabla 4 y la Figura 5.

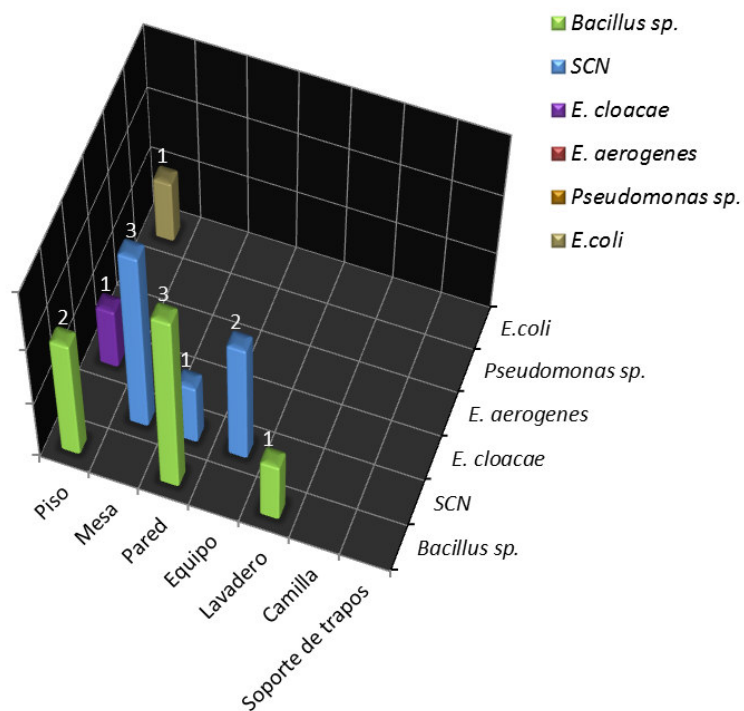


Figura 4. Bacterias aisladas del área de quirófano antes de la desinfección de la clínica A

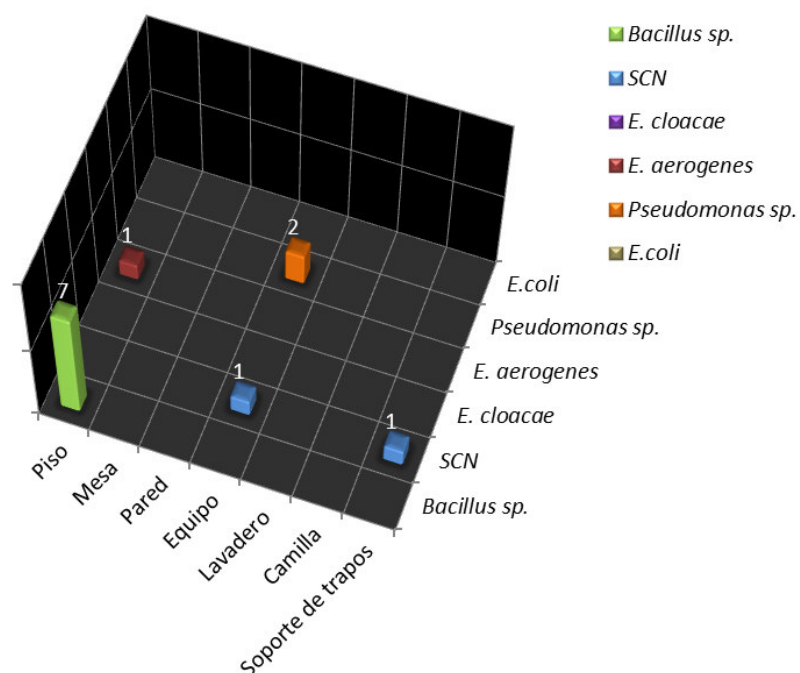


Figura 5. Bacterias aisladas del área de quirófano después de la desinfección de la clínica A

Tabla 4. Bacterias aisladas según clínica y superficie muestreada antes y después de la desinfección

SUPERFICIE	CEPAS DE LA CLÍNICA A		CEPAS DE LA CLÍNICA B	
	Antes	Después	Antes	Después
Piso	<i>Enterobacter cloacae</i> (1), <i>Bacillus sp.</i> (2) <i>E. coli</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1) <i>Bacillus sp.</i> (7)	SCN (4)	SCN (2)
Mesa	SCN (3)	-	SCN (7) <i>Bacillus sp.</i> (3)	SCN (1)
Pared	SCN (1) <i>Bacillus sp.</i> (3)	-	SCN (1) <i>Bacillus sp.</i> (1)	<i>Bacillus sp.</i> (2)
Equipo	SCN (2)	SCN (1) <i>Pseudomonas sp.</i> (2)	SCN (2) <i>Enterobacter cloacae</i> (1)	SCN (2)
Lavadero	<i>Bacillus sp.</i> (1)	-	SCN (2) <i>Bacillus sp.</i> (1)	<i>Bacillus sp.</i> (3)
Camilla	-	-	-	SCN (1) <i>Bacillus sp.</i> (2)
Soporte de trapos	-	SCN (1)	*	*

* No se realizó hisopado para aislamiento.

Las especies bacterianas aisladas en el área de quirófano de la clínica B antes de la desinfección están en la Tabla 4 y la Figura 6, las especies bacterianas aisladas después de la desinfección están en la Tabla 4 y la Figura 7.

En la clínica A, las superficies del área de quirófano con mayor aislamiento bacteriano es el piso con 12 cepas y en la clínica B las superficies con mayor aislamiento son las mesas con 11 cepas. Además la clínica B presentó mayor aislamiento bacteriano, con 34 cepas, que la clínica A con 26 cepas (Tabla3).

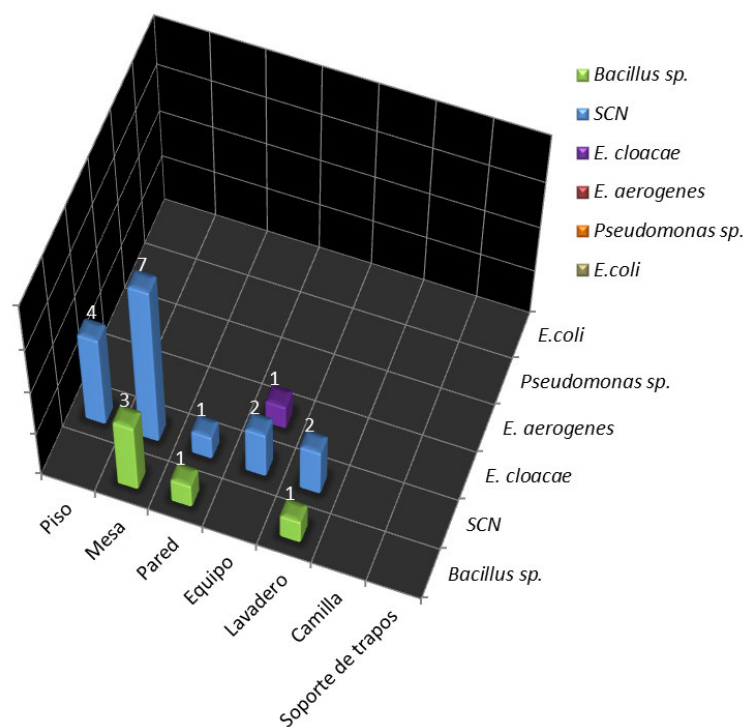


Figura 6. Bacterias aisladas del área de quirófano antes de la desinfección de la clínica B

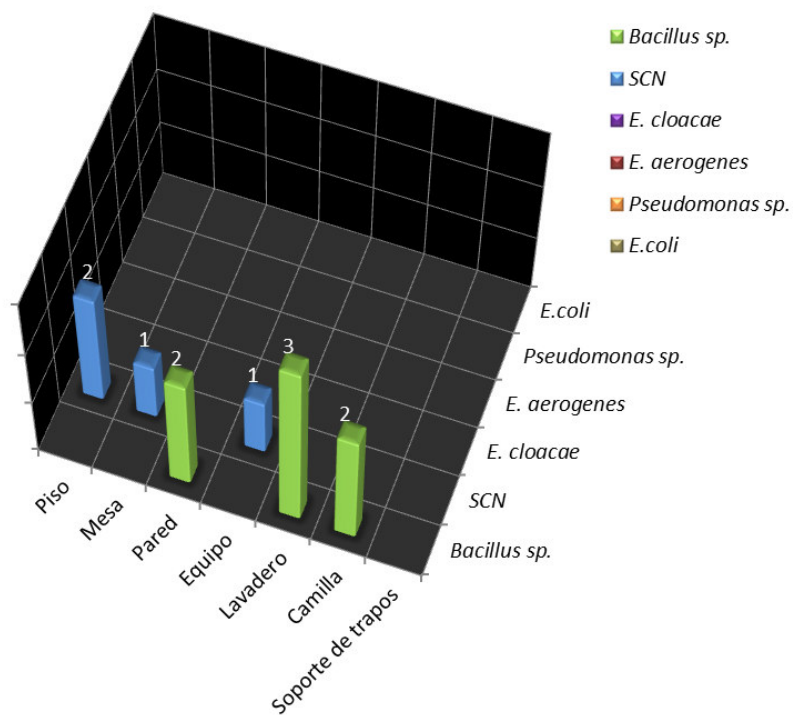


Figura 7. Bacterias aisladas del área de quirófano después de la desinfección de la clínica B

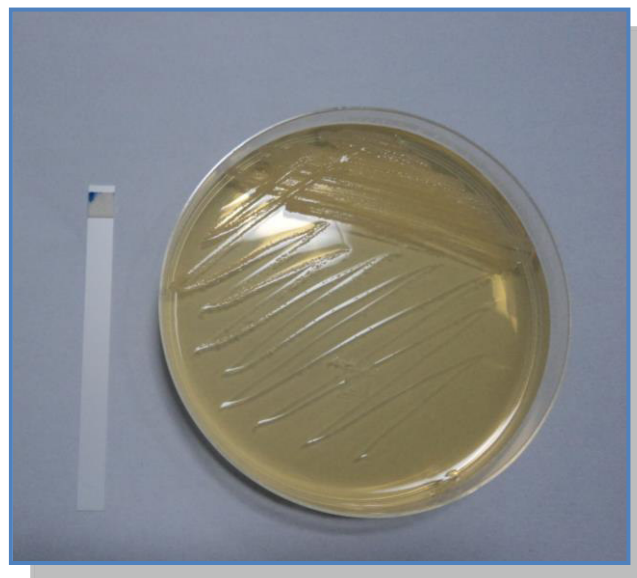


Figura 8. Cultivo de la cepa 91 identificada como *Pseudomonas sp.*, en agar TSA. Se muestra una reacción positiva de la prueba de oxidasa. Se aisló de la superficie de un equipo de la clínica A.

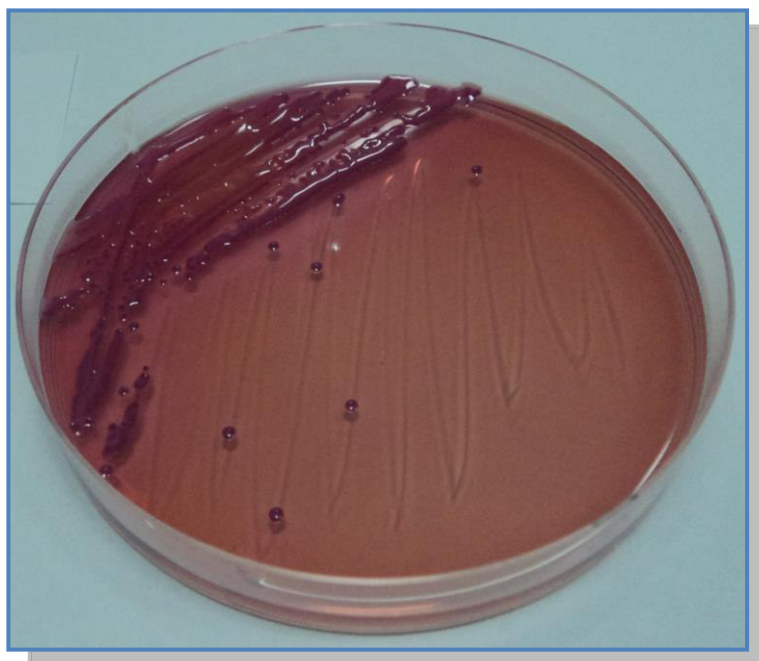


Figura 9. Cultivo de la cepa número 96 en Agar Mac Conkey, aislada de la superficie de un equipo de la clínica B.



Figura 10. Pruebas bioquímicas diferenciales del sistema API 20 E de la cepa número 96 identificada como *Enterobacter cloacae*, aislada de la superficie de un equipo de la clínica B.

V.2. Ensayo de neutralización

El polisorbato 80 al 2% más lecitina de soya al 2,5% y el polisorbato 80 al 5% más lecitina al 1,5% ensayados para las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, cumplieron con el criterio de validez de neutralizante, siendo el porcentaje de polisorbato 80 al 2% más lecitina de soya al 2,5% el neutralizante que presentó una mayor protección de las células bacterianas, de los desinfectantes Green Disinfectant y Forward con un 96% y 90% respectivamente para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, y con un 93% y 90% de protección de las células bacterianas respectivamente para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, por ende una mayor efectividad de neutralización. Además el polisorbato 80 al 2% más lecitina de soya al 2,5% cumple también el criterio de validez para las cepas 34, 40, 67, 96, 98, 58 y 59, (Tabla 5).

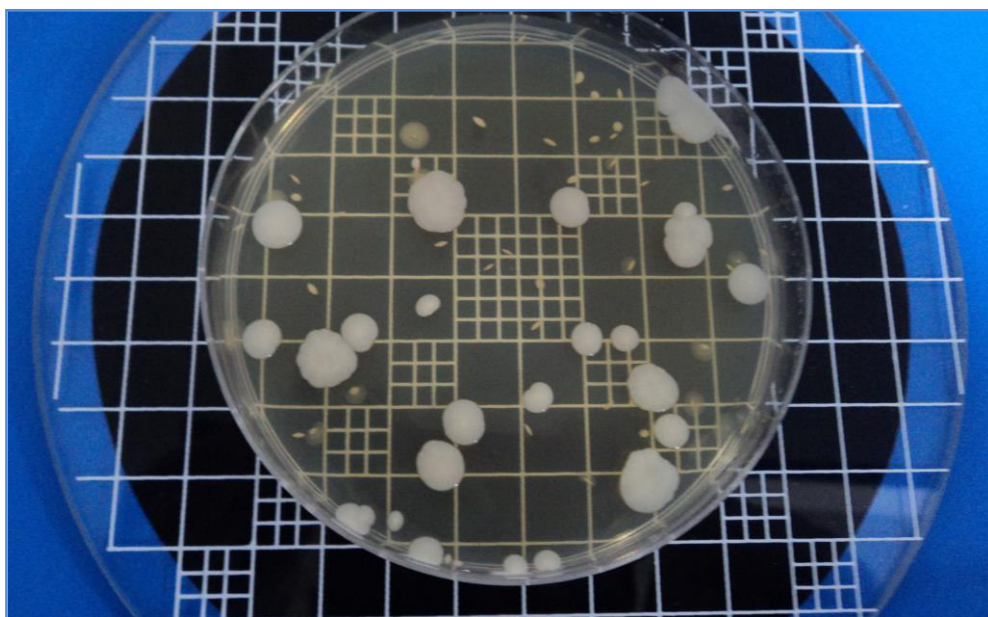


Figura 11. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Las tres soluciones al 0,5%, 0,8% y 1,0% de tiosulfato de sodio ensayadas para las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, cumplieron con el criterio de validez de neutralizante, siendo tiosulfato de sodio al 1,0% el que presentó una mayor protección de las células bacterianas, con una protección del 92% y 94% respectivamente, del hipoclorito de sodio, y por ende, una mayor efectividad de neutralización. El tiosulfato de sodio al 1,0% también cumplió con el criterio de validez de neutralizante para las cepas 34, 40, 67, 96, 98, 58 y 59 (Tabla 6).

Tabla 5.- Resultados de la prueba de neutralizante para Green Desinfectant y Forward

Neutralizante	Suspensión bacteriana			Green Desinfectant							Forward						
				A			B			Criterio de validez	A			B			Criterio de validez
	p1/ p2	p1'/ p2'	R ₁ / R ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	C ₁ / C ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	n ₁ / n ₂	R ≅ C ; <10% n ≥0,5 C	p1/ p2	p1'/ p2'	C ₁ / C ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	n ₁ / n ₂	R ≅ C ; <10% n ≥0,5 C
Staphylococcus aureus ATCC 6538																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	120/ 132	134/ 130	126/ 132	116/ 124	128/ 136	120/ 132	121/ 113	126/ 122	117/ 124	129 ≅ 126; 2% 121≥0,5x126; 96%	113/ 133	141/ 133	123/ 137	118/ 112	120/ 116	115/ 118	129 ≅ 130; 1% 117≥0,5x130; 90%
Polisorbato 80 al 5% más Lecitina 1,5%				115/ 132	122/ 130	124/ 126	106/ 117	118/ 125	112/ 122	129 ≅ 125; 3% 117≥0,5x125;94%	127/ 135	139/ 130	131/ 135	101/ 110	108/ 112	106/ 110	129 ≅ 133; 3% 108≥0,5x133;81%
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	145/ 157	150/ 139	151/ 145	168/ 152	140/ 144	160/ 142	150/ 144	132/ 134	147/ 133	148 ≅ 151; 2% 140≥0,5x151; 93%	148/ 158	156/ 152	153/ 154	141/ 147	136/ 141	144/ 139	148 ≅ 154; 4% 142≥0,5x154; 92%
Polisorbato 80 al 5% más Lecitina 1,5%				143/ 149	136/ 140	146/ 138	129/ 139	132/ 127	134/ 130	148 ≅ 142; 4% 132≥0,5x142;93%	154/ 168	158/ 140	161/ 149	133/ 145	126/ 130	139/ 128	148 ≅ 155; 5% 134≥0,5x155;86%
Cepa 34																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	186/ 179	192/ 188	183/ 190	189/ 185	198/ 208	187/ 203	177/ 182	183/ 189	180/ 186	187 ≅ 195; 5% 183≥0,5x195;94%	180/ 177	199/ 211	179/ 205	168/ 172	185/ 188	170/ 187	187 ≅ 192 ;3% 179≥0,5x192;93%
Cepa 40																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	144/ 148	130/ 142	146/ 136	154 /148	149/ 139	151/ 144	127/ 135	124/ 130	131/ 127	141 ≅ 148; 5% 129≥0,5x148;87%	151/ 156	144/ 131	154/ 138	139/ 145	138/ 125	142/ 132	141 ≅ 146 ;4% 137≥0,5x146;94%
Cepa 67																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	181/ 173	194/ 188	177/ 191	179/ 186	189/ 181	183/ 185	167/ 188	173/ 180	178/ 177	184 ≅ 184; 0% 178≥0,5x184;97%	174/ 170	189/ 183	172/ 186	169/ 173	183/ 178	171/ 181	184 ≅ 179 ; 3% 176≥0,5x179;98%
Cepa 96																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	202/ 212	223/ 217	207/ 220	196/ 206	216/ 211	201/ 214	189/ 197	204/ 210	193/ 207	214 ≅ 208 ; 3% 200≥0,5x208;96%	191/ 199	208/ 217	195/ 213	183/ 192	203/ 209	188/ 206	214 ≅ 204 ;5% 197≥0,5x204;97%
Cepa 98																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	212/ 216	219/ 227	214/ 223	203/ 213	223/ 233	208/ 228	200/ 208	223/ 233	204/ 228	219 ≅ 218 ;0,5% 216≥0,5x218;99%	198/ 206	225/ 211	202/ 218	204/ 199	211/ 218	202/ 215	219 ≅ 210 ; 4% 209≥0,5x210;100%

Tabla 5.- Resultados de la prueba de neutralizante para Green Desinfectant y Forward (continuación)

Neutralizante	Suspensión bacteriana			Green Desinfectant							Forward						
				A			B			Criterio de validez	A			B			Criterio de validez
	p1/ p2	p1'/ p2'	R ₁ / R ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	C ₁ / C ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	n ₁ / n ₂	R ≅ C ; <10% n ≥ 0,5 C	p1/ p2	p1'/ p2'	C ₁ / C ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	n ₁ / n ₂	R ≅ C ; <10% n ≥ 0,5 C
Cepa 91																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	233/ 241	239/ 244	237 / 242	226/ 214	250/ 246	220 / 248	223/ 229	244/ 235	226 / 240	240 ≅ 234 ; 3% 233 ≥ 0,5x234; 100%	234/ 248	232/ 239	241 / 236	219/ 230	238/ 231	225 / 235	240 ≅ 239 ; 0,4% 230 ≥ 0,5x239; 96%
Cepa 58																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	157/ 148	142/ 148	153 / 145	146/ 156	141/ 137	151 / 139	141/ 146	138/ 131	144 / 135	149 ≅ 145 ; 0,4% 140 ≥ 0,5x145; 96%	163/ 151	148/ 130	157 / 139	146/ 139	137/ 132	143 / 135	149 ≅ 148 ; 0,4% 139 ≥ 0,5x148; 96%
Cepa 59																	
Polisorbato 80 al 2% más Lecitina al 2,5%	151/ 158	166/ 160	155 / 163	154/ 142	159/ 161	148 / 160	141/ 139	154/ 158	140 / 156	159 ≅ 154 ; 3% 148 ≥ 0,5x154; 96%	158/ 148	166/ 168	153 / 167	150/ 143	161/ 155	147 / 158	159 ≅ 160 ; 1% 153 ≥ 0,5x160; 96%

p1, p2: conteo de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo, respectivamente.

p1', p2': conteo de la placa 1 y la placa 2 del duplicado, respectivamente.

R1, R2: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del conteo de la suspensión bacteriana.

C1, C2: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del tubo A.

n₁, n₂: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del tubo B.

Tabla 6.- Resultados de la prueba de neutralizante para hipoclorito de sodio

Neutralizante	Suspensión bacteriana			Hipoclorito de sodio						
				A			B			Criterio de validez
	p1/ p2	p1'/ p2'	R ₁ / R ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	C ₁ / C ₂	p1/ p2	p1'/ p2'	n ₁ / n ₂	R ≅ C ; <10% n ≥0,5 C
Staphylococcus aureus ATCC 6538										
Tiosulfato de sodio 0.5%	120/ 132	134/ 130	126/ 132	126/ 118	128/ 122	122/ 125	104/ 96	98/ 96	100/ 97	129 ≅ 124 ; 4% 99≥0,5x124;80%
Tiosulfato de sodio 0.8%				122/ 108	134/ 126	115/ 130	105/ 101	124/ 95	103/ 110	129 ≅ 123 ; 5% 107≥0,5x123;87%
Tiosulfato de sodio 1.0%				115/ 125	130/ 142	120/ 136	121/ 116	118/ 114	119/ 116	129 ≅ 128 ; 1% 118≥0,5x128; 92%
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027										
Tiosulfato de sodio 0.5%	145/ 157	150/ 139	151/ 145	149/ 156	141/ 134	153/ 138	119/ 127	112/ 107	123/ 110	148 ≅ 146 ; 1% 117≥0,5x146;80%
Tiosulfato de sodio 0.8%				157/ 143	139/ 131	150/ 135	131/ 126	130/ 123	129/ 127	148 ≅ 143 ; 3% 128≥0,5x143;90%
Tiosulfato de sodio 1.0%				156/ 164	140/ 152	160/ 146	144/ 152	141/ 136	148/ 139	148 ≅ 153 ; 3% 144≥0,5x153; 94%
Cepa 34										
Tiosulfato de sodio 1.0%	186/ 179	192/ 188	183/ 190	178/ 170	193/ 199	174/ 196	170/ 168	181/ 174	169/ 178	187 ≅ 185 ; 1% 178≥0,5x185;96%
Cepa 40										
Tiosulfato de sodio 1.0%	144/ 148	130/ 142	146/ 136	141/ 139	130/ 124	140/ 127	133/ 131	130/ 129	132/ 130	141 ≅ 134 ; 5% 131≥0,5x134;98%
Cepa 67										
Tiosulfato de sodio 1.0%	181/ 173	194/ 188	177/ 191	167/ 173	180/ 188	170/ 184	161/ 168	176/ 182	165/ 179	184 ≅ 177 ; 4% 172≥0,5x177;97%
Cepa 96										
Tiosulfato de sodio 1.0%	202/ 212	223/ 217	207/ 220	192/ 204	201/ 205	198/ 203	189/ 194	212/ 197	192/ 205	214 ≅ 201 ; 6% 199≥0,5x201;99%
Cepa 98										
Tiosulfato de sodio 1.0%	212/ 216	219/ 227	214/ 223	222/ 198	205/ 211	212/ 208	198/ 203	210/ 216	201/ 213	219≅ 210 ; 4% 207≥0,5x210;99%
Cepa 91										
Tiosulfato de sodio 1.0%	233/ 241	239/ 244	237/ 242	223/ 237	242/ 233	230/ 238	228/ 227	227/ 234	228/ 231	240 ≅ 234 ; 3% 230≥0,5x234;98%
Cepa 58										
Tiosulfato de sodio 1.0%	157/ 148	142/ 148	153/ 145	141/ 148	136/ 144	145/ 140	139/ 143	133/ 136	141/ 135	149 ≅143 ; 4% 138≥0,5x143;97%
Cepa 59										
Tiosulfato de sodio 1.0%	151/ 158	166/ 160	155/ 163	150/ 147	156/ 160	149/ 158	144/ 149	152/ 156	147/ 154	159 ≅ 154 ; 3% 151≥0,5x154;98%

p1, p2: conteo de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo, respectivamente.

p1', p2': conteo de la placa 1 y la placa 2 del duplicado, respectivamente.

R1, R2: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del conteo de la suspensión bacteriana.

C1, C2: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del tubo A.

n₁, n₂: Promedio de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo y del duplicado respectivamente, del tubo B.

V.3. Ensayo de la actividad bactericida de desinfectantes

En el caso del desinfectante Green Desinfectant, ninguna cepa ensayada creció a las diluciones 1/60, 1/120, 1/240, 1/480 y 1/960. Para el desinfectante Forward, ninguna cepa ensayada creció a las diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y 1/160. En el caso del hipoclorito de sodio, ninguna cepa ensayada creció a las concentraciones de 0,1%, 0,05% y 0,01%. Se observó crecimiento bacteriano de las cepas enfrentadas con los desinfectantes a diluciones mayores a las indicadas anteriormente, esto se muestra en la Tabla 7. La figura 12 muestra el crecimiento de la cepa 91 después del enfrentamiento con el desinfectante Green Desinfectant a una dilución de 1/3890.



Figura 12. Cepa 91 enfrentada al desinfectante Green Desinfectant en una dilución 1/3890.

Tabla 7 Resultados de la actividad bactericida de los desinfectantes

Microorganismo	Control	Green Desinfectant (v/v)				Forward (v/v)				Hipoclorito de sodio (%)			
		1/960	1/1920	1/3840	1/7680	1/160	1/320	1/640	1/1280	0,01	0,005	0,001	0,0005
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538													
n1/n2 ; n1'/n2'	154/142; 140/136	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	9/10; 12/8	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	120/121; 113/117	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	148/138	0/0	0/0	0/0	10/10	0/0	0/0	0/0	126/115	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	5,17/ 5,14	>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	4,07/ 4,08	>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	>6,17/ >6,14	- / -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027													
n1/n2 ; n1'/n2'	150/136; 140/134	0/0;0/0	5/8; 12/16	Inc/Inc; Inc/Inc	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	106/10 8;98/10 5	Inc/Inc; Inc/Inc	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	143/137	0/0	7/13	Inc/Inc	Inc/Inc	0/0	107/10 2	Inc/Inc	Inc/Inc	0/0	0/0	Inc/Inc	Inc/Inc
R/R'		>6,16/ >6,14	5,31/ 5,02	- / -	- / -	>6,16/ >6,14	4,13/ 4,13	- / -	- / -	>6,16/ >6,14	>6,16/ >6,14	- / -	- / -
Cepa 34													
n1/n2 ; n1'/n2'	184/192; 178/186	0/0;0/0	2/5; 8/10	70/62; 57/64	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	188/182	0/0	4/9	66/61	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0;0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,27/ >6,26	5,67/ 5,31	4,45/ 4,47	- / -	>6,27/ >6,26	>6,27/ >6,26	>6,27/ >6,26	- / -	>6,27/ >6,26	>6,27/ >6,26	>6,27/ >6,26	- / -
Cepa 40													
n1/n2 ; n1'/n2'	140/142; 158/150	0/0;0/0	0/0;0/0	72/74; 68/72	112/123; 120/128	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	28/36; 30/27	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	141/154	0/0	0/0	73/70	118/124	0/0	0/0	0/0	32/27	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,15/ >6,19	>6,15/ >6,19	4,29/ 4,34	4,08/ 4,09	>6,15/ >6,19	>6,15/ >6,19	>6,15/ >6,19	4,64/ 4,76	>6,15/ >6,19	>6,15/ >6,19	>6,15/ >6,19	- / -

Tabla 7 Resultados de la actividad bactericida de los desinfectantes (continuación 1)

Microorganismo	Control	Green Desinfectant (v/v)				Forward (v/v)				Hipoclorito de sodio (%)			
		1/960	1/1920	1/3840	1/7680	1/160	1/320	1/640	1/1280	0,01	0,005	0,001	0,0005
Cepa 67													
n1/n2 ; n1'/n2'	194/183; 180/186	0/0;0/0	0/0;0/0	43/50; 58/51	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	28/36; 30/27	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	8/12; 5/8
p/p'	189/183	0/0	0/0	47/55	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	32/29	0/0	0/0	0/0	10/7
R/R'		>6,28/ >6,26	>6,28/ >6,26	4,59/ 4,52	- / -	>6,28/ >6,26	>6,28/ >6,26	>6,28/ >6,26	4,77/ 4,80	>6,28/ >6,26	>6,28/ >6,26	>6,28/ >6,26	5,28/ 5,42
Cepa 96													
n1/n2 ; n1'/n2'	212/208 196/185	0/0;0/0	0/0;0/0	21/18; 14/17	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	210/191	0/0	0/0	20/16	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,32/ >6,28	>6,32/ >6,28	5,02/ 5,08	- / -	>6,32/ >6,28	>6,32/ >6,28	>6,32/ >6,28	- / -	>6,32/ >6,28	>6,32/ >6,28	>6,32/ >6,28	- / -
Cepa 98													
n1/n2 ; n1'/n2'	189/191; 182/188	0/0;0/0	0/0;0/0	7/2;10/7	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	15/18; 10/8	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	190/185	0/0	0/0	5/9	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	17/9	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,28/ >6,27	>6,28/ >6,27	5,58/ 5,31	- / -	>6,28/ >6,27	>6,28/ >6,27	>6,28/ >6,27	5,05/ 5,31	>6,28/ >6,27	>6,28/ >6,27	>6,28/ >6,27	- / -
Cepa 91													
n1/n2 ; n1'/n2'	230/244; 226/232	0/0;0/0	0/0;0/0	220/232; 216/222	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	305/299; 287/278	Inc/Inc; Inc/Inc	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	237/229	0/0	0/0	226/219	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc	0/0	302/283	Inc/Inc	Inc/Inc
R/R'		>6,53/ >6,36	>6,53/ >6,36	4,17/ 4,02	- / -	>6,53/ >6,36	>6,53/ >6,36	>6,53/ >6,36	- / -	>6,53/ >6,36	3,89/ 3,91	- / -	- / -

Tabla 7 Resultados de la actividad bactericida de los desinfectantes (continuación 2)

Microorganismo	Control	Green Desinfectant (v/v)				Forward (v/v)				Hipoclorito de sodio (%)			
		1/960	1/1920	1/3840	1/7680	1/160	1/320	1/640	1/1280	0,01	0,005	0,001	0,0005
Cepa 58													
n1/n2 ; n1'/n2'	144/156; 158/154	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	186/179; 175/167	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	14/12; 13/15	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	8/12; 10/13
p/p'	150/156	0/0	0/0	0/0	183/171	0/0	0/0	0/0	13/14	0/0	0/0	0/0	10/12
R/R'		>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	3,91/ 3,92	>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	5,06/ 5,05	>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	>6,18/ >6,19	5,18/ 5,11
Cepa 59													
n1/n2 ; n1'/n2'	154/160; 161/167	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	67/62; 68/74	0/0;0/0	0/0;0/0	0/0;0/0	Inc/Inc; Inc/Inc
p/p'	158/164	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc	0/0	0/0	0/0	65/71	0/0	0/0	0/0	Inc/Inc
R/R'		>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	- / -	>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	4,39/ 4,36	>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	>6,20/ >6,21	- / -

n1, n2: Conteo de la placa 1 y la placa 2 del primer ensayo, respectivamente.

n1', n2': Conteo de la placa 1 y la placa 2 del duplicado, respectivamente.

p, p': Promedio del conteo de las placas del primer ensayo y del duplicado, respectivamente.

R, R': Reducción logarítmica del primer ensayo y del duplicado, respectivamente.

Inc: Incontable

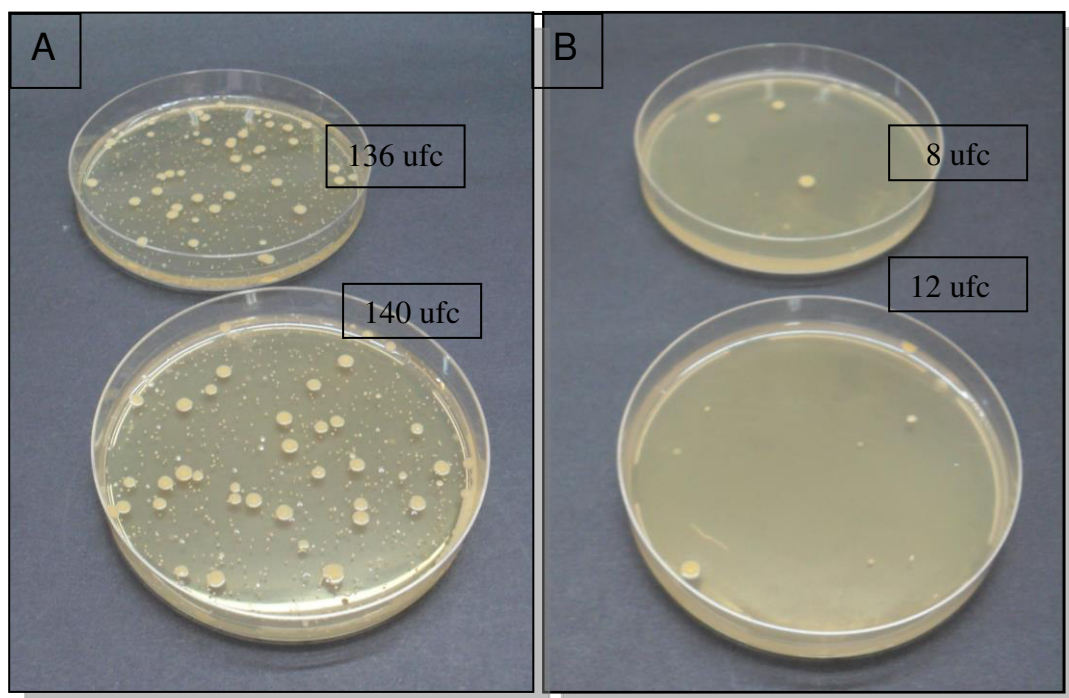


Figura13. Recuento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, A: Recuento del inóculo y B: Recuento de ufc de la cepa enfrentada al desinfectante Green Desinfectant en una dilución 1/7680.

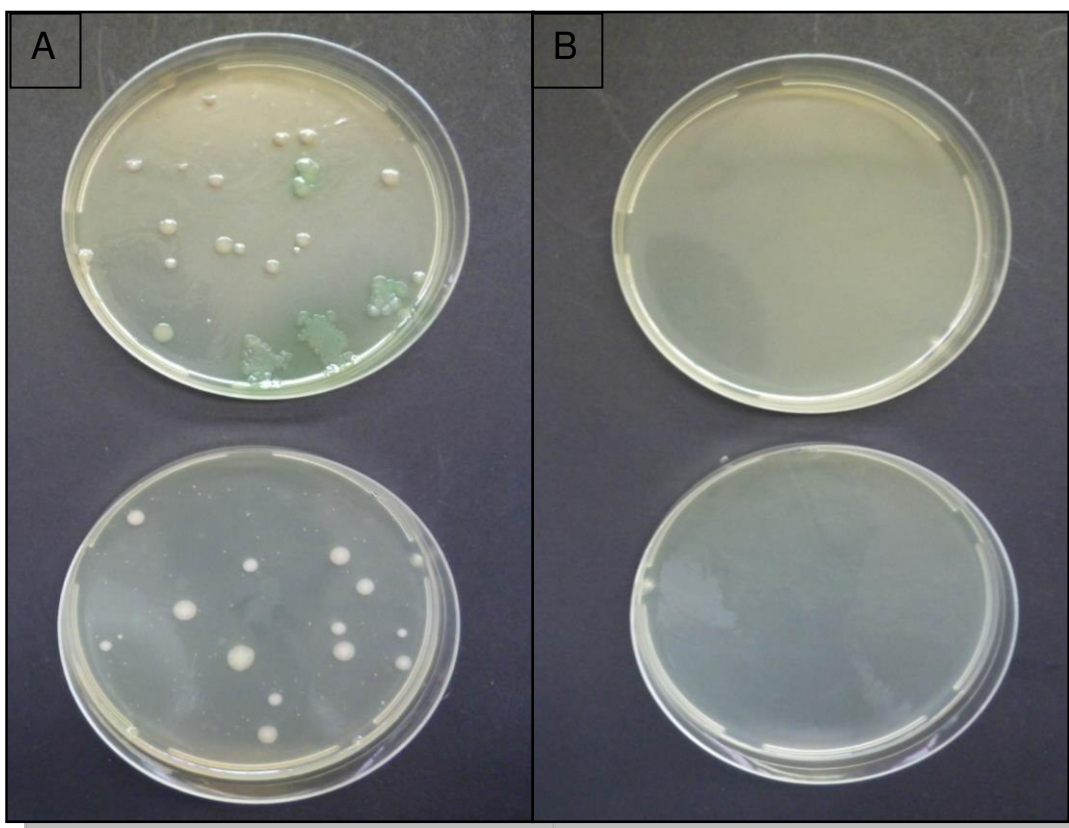


Figura 14. Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 enfrentada con el desinfectante Forward en una dilución A 1/320 y B 1/160.

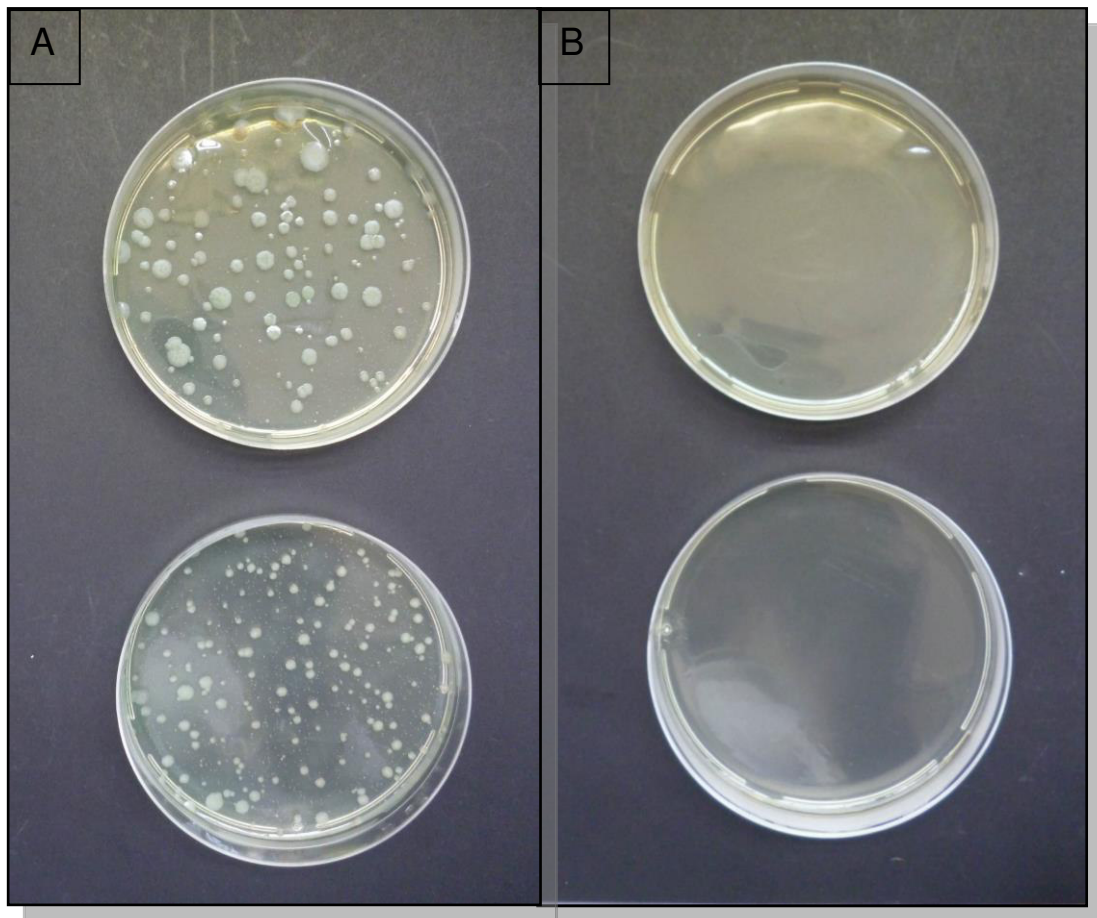


Figura 15. Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 enfrentada con el desinfectante hipoclorito de sodio. A: al 0,001% y B: al 0,005%.

Tabla 8 Concentración Mínima Bactericida (CMB) expresada en porcentaje y reducción logarítmica de los desinfectantes

Microorganismo	Concentración Mínima Bactericida					
	Green Disinfectant (%v/v)	\bar{R}	Forward (%v/v)	\bar{R}	Hipoclorito de sodio (%p/v)	\bar{R}
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,0130	5,16	0,1563	>6,16	0,0010	>6,16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,0521	5,17	0,6250	>6,15	0,0050	>6,15
Cepa 34	0,0521	5,49	0,1563	>6,27	0,0010	>6,27
Cepa 40	0,0521	>6,17	0,1563	>6,17	0,0010	>6,17
Cepa 67	0,0521	>6,27	0,1563	>6,27	0,0005	5,35
Cepa 96	0,0260	5,05	0,1563	>6,30	0,0010	>6,30
Cepa 98	0,0260	5,45	0,1563	5,18	0,0010	>6,28
Cepa 91	0,0521	>6,45	0,1563	>6,45	0,0050	>6,45
Cepa 58	0,0260	>6,19	0,0781	5,05	0,0005	5,15
Cepa 59	0,0260	>6,21	0,1563	>6,21	0,0010	>6,21

\bar{R} : Promedio de la reducción logarítmica del primer y segundo ensayo
1% es 10 000 ppm , 1ppm es 1mg/L es 1µg/ml

La CMB para un desinfectante es la menor concentración que logra una reducción de la población bacteriana mayor a 5 log en todas las cepas ensayadas. La CMB para Green Disinfectant fue de 0,0521 % (v/v), siendo la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, la Cepa 34, la Cepa 67, la Cepa 40 y la Cepa 91 las cepas que tienen este porcentaje. La CMB para Forward fue de 0,6250 % (v/v), siendo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 la única cepa que tiene este porcentaje. Para hipoclorito de sodio la CMB fue de 0,0050 % (p/v) (50ppm), siendo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y la Cepa 91 las cepas que tiene este porcentaje (Tabla 8).

Tabla 9 Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los desinfectantes expresada en diluciones

Microorganismo	Concentración Mínima Bactericida					
	Green Disinfectant		Forward		Hipoclorito de sodio	
	D	D'	D	D'	(%p/v)	D''
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1/7680	1/128	1/640	1/64	0,0010	1/100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1/1920	1/32	1/160	1/16	0,005	1/20
Cepa 34	1/1920	1/32	1/640	1/64	0,001	1/100
Cepa 40	1/1920	1/32	1/640	1/64	0,001	1/100
Cepa 67	1/1920	1/32	1/640	1/64	0,0005	1/200
Cepa 96	1/3840	1/64	1/640	1/64	0,001	1/100
Cepa 98	1/3840	1/64	1/640	1/64	0,001	1/100
Cepa 91	1/1920	1/32	1/640	1/64	0,005	1/20
Cepa 58	1/3840	1/64	1/1280	1/128	0,0005	1/200
Cepa 59	1/3840	1/64	1/640	1/64	0,001	1/100

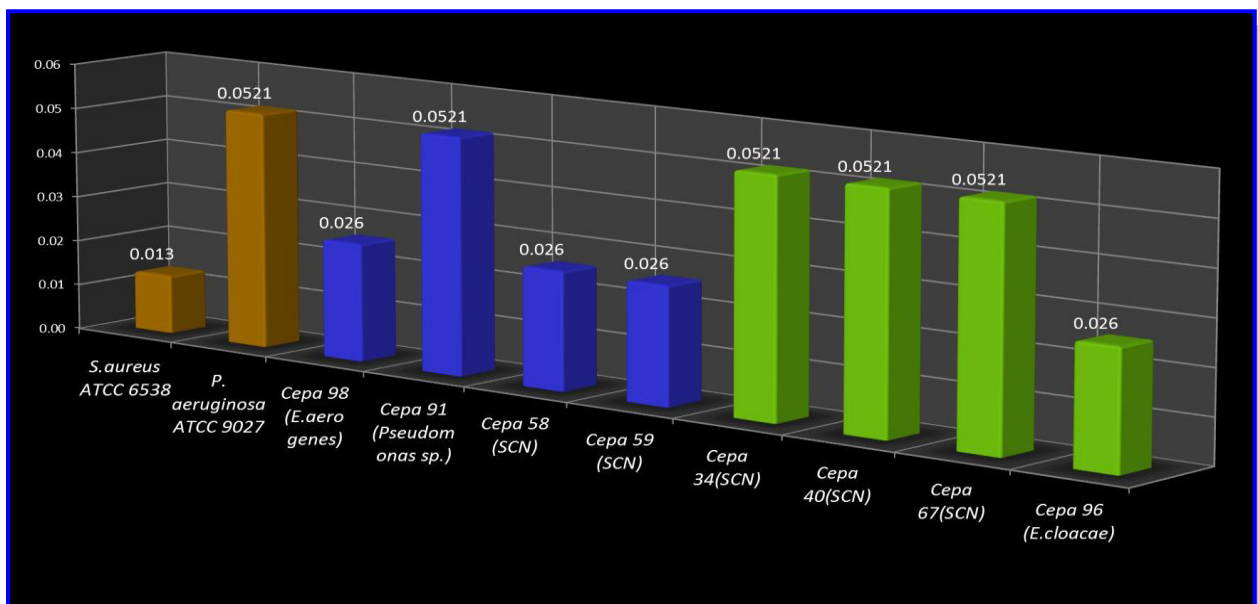
D: Dilución de la CMB

D': Dilución de D respecto a la concentración recomendada por el fabricante

D'': Dilución respecto a la concentración recomendada según RM 1472-2002

Una comparación de las diluciones que son las CMBs y la dilución respecto a las concentraciones recomendadas por el fabricante se encuentra en la Tabla 9, donde se muestra que la CMB es una dilución de 1/32 de la concentración recomendada por el fabricante para los desinfectantes Green Disinfectant y 1/16 para Forward; además para el hipoclorito de sodio la CMB es una dilución de 1/20 de la concentración recomendada según Resolución Ministerial N° 1472-2002.

Una comparación de las CMB de los desinfectantes se muestra en la figura 16, figura 17, figura 18 y figura 19.

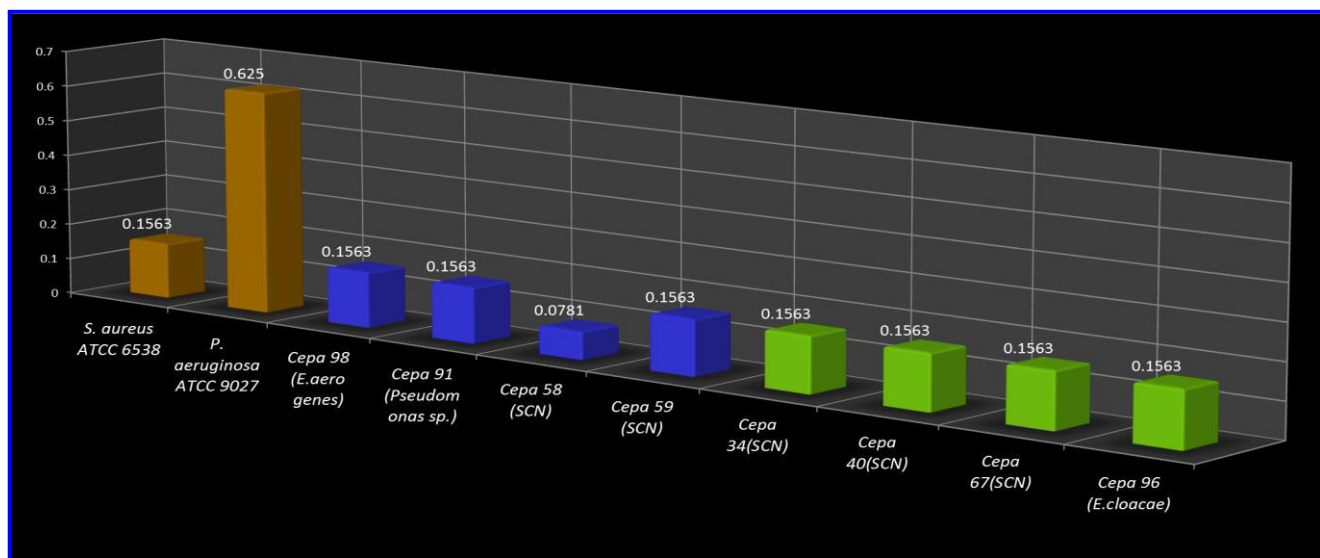


Clínica
A



Clínica
B

Figura 16. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de Green Desinfectant

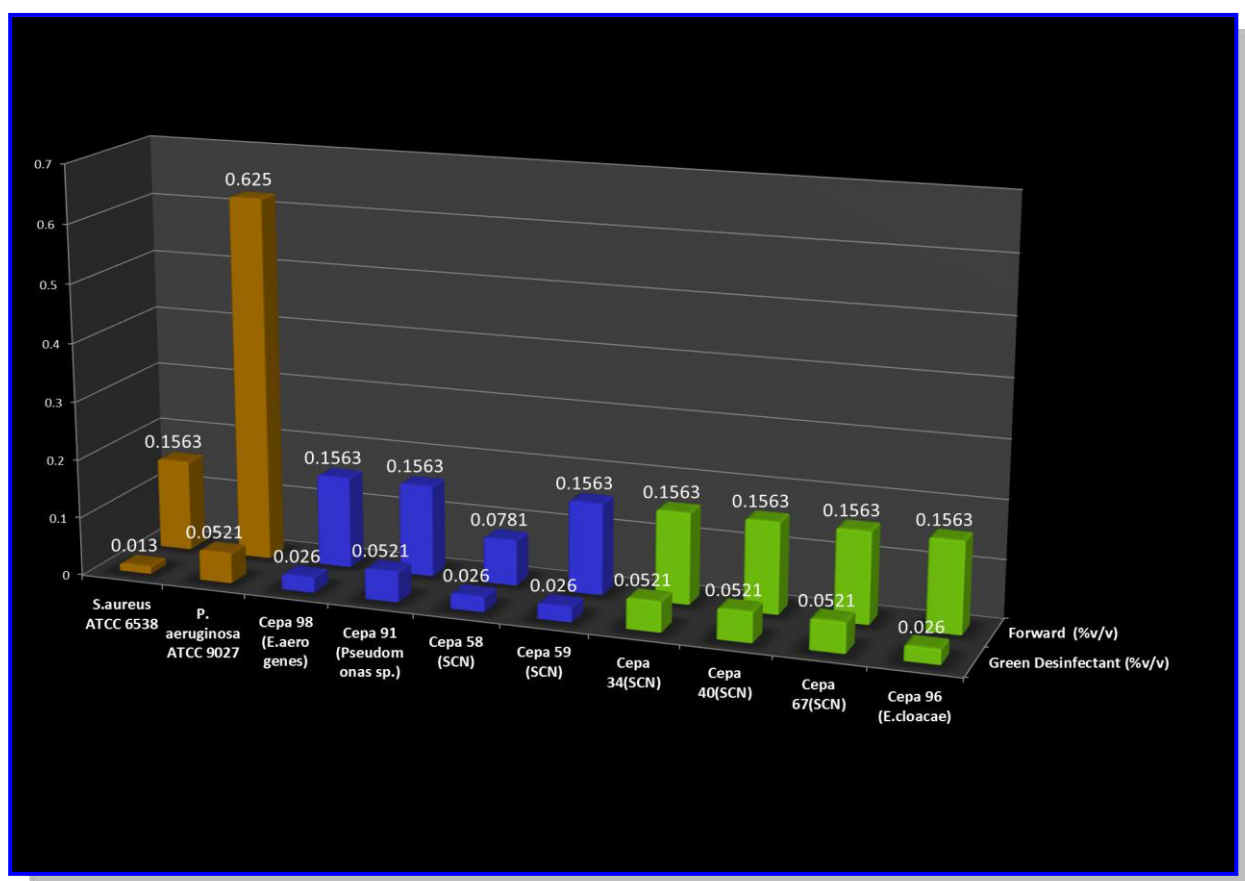


Clínica
A



Clínica
B

Figura 17. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de Forward

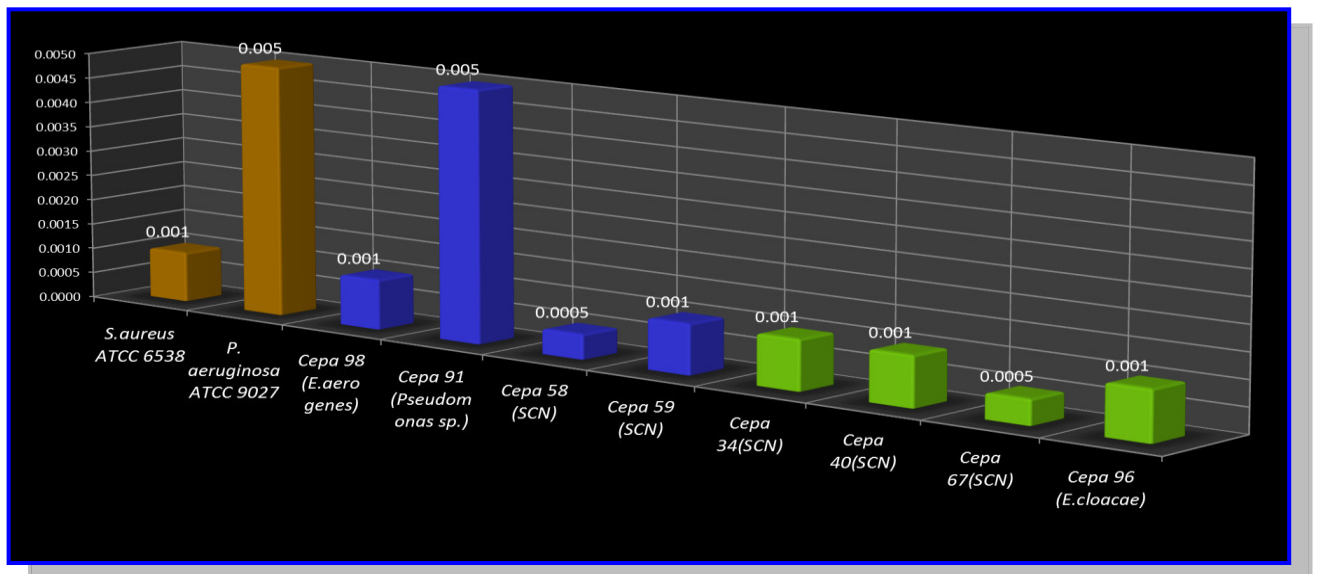


Clínica
A



Clínica
B

Figura 18. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los desinfectantes a base amonio cuaternario Green Desinfectant y Forward



Clínica
A



Clínica
B

Figura 19. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del hipoclorito de sodio

VI. DISCUSIÓN

Las bacterias Gram positivas han sido las más abundantes, de las superficies ambientales del área quirúrgica de las dos clínicas. Siendo el grupo bacteriano más abundante de la clínica B los SCN, teniendo un 62% y en la clínica A son el segundo más abundante con un 31%. Resultados similares fueron encontrados por Ekrami Alireza *et al.* (2011) en un estudio realizado en superficies ambientales de siete hospitales donde los SCN fueron los más abundantes con un 36.1%.

Se aislaron especies bacterianas diferentes después de la desinfección a las aisladas antes de la desinfección como *Pseudomonas sp.* y *Enterobacter aerogenes* en la clínica A pesar que se hisoparon la mismas áreas antes y después de la desinfección, probablemente hubo una contaminación cruzada del paño o de la solución desinfectante.

Sin bien hay una disminución de los aislamientos después de la desinfección, se aislaron algunas cepas de SCN y *Bacillus sp.* de algunas superficies indicando que hay factores que están permitiendo la permanencia de algunas bacterias, entre los que puede estar un inadecuado procedimiento de desinfección, la presencia de materia orgánica que puede inactivar a los amonios cuaternarios y al hipoclorito de sodio por lo que es muy importante el paso previo de limpieza de la superficie antes de aplicar el desinfectante.

Las CMB para los desinfectantes ensayados han sido mucho menores que las concentraciones recomendadas para su uso. Siendo las CBM para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 64, 100 y 128 veces menor que las concentraciones recomendadas para Forward, Hipoclorito de sodio y Green Desinfectant respectivamente y las CMB de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 es 16, 20 y 32

veces menor que las concentraciones recomendadas para Forward, Hipoclorito de sodio y Green Desinfectant respectivamente. En un estudio donde ensayaron con tres desinfectantes, el cloruro de benzalconio (1% w / v), clorhexidina gluconato (4% w / v) y triclosan (1% w / v) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y cepas multidrogorresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando concentraciones mínimas bactericidas considerablemente menores a la indicada por el fabricante, siendo las CMB de todos los biocidas para todos los aislados de SARM entre 100-1000 veces menor que la recomendada por el fabricante y las CMB para los aislados de *P. aeruginosa* fueron de 10-100 veces menor que las concentraciones recomendadas de estos biocidas (Smith y Hunter, 2008).

De las cepas ensayadas si bien *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 presentó la misma CMB que las cepa 34, la cepa40, la cepa67 y la cepa 91 siendo esta 0,0521 % (v/v) para Green Desinfectant, la reducción logarítmica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 es menor a las demás cepas indicando esto una mayor resistencia al desinfectante. Para el desinfectante Forward *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fue la cepa con la mayor CMB, que fue 0,625 % (v/v) y para el hipoclorito de sodio las cepas con la mayor CMB fueron *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y la cepa 91 con 0.005% cada una. Si bien las CMB son bastante menores a las recomendadas para su uso *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fue la cepa más resistente, a los desinfectantes que se le enfrentó en los ensayos, esto es concordante con la literatura que indica a *Pseudomonas aeruginosa* como una especie bastante resistente a múltiples desinfectantes.

Entre los dos desinfectantes a base de amonio cuaternario Green Desinfectant resultó el más efectivo dado que presentó la menor CMB, la cual es 0,0521% v/v, siendo esta CMB menor a la encontrada para el desinfectante a base de amonio cuaternario Quacide MC7, la cual fue 0,125 % v/v (Taboada *et al.*, 2007).

La CMB de hipoclorito de sodio para todas las cepas ensayadas es de 0.005% que equivale a 50µg/ml (50 ppm) siendo este el resultado encontrado para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y la Cepa 91, para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 es de 0,0005% equivalente a 5µg/ml (5 ppm) esta es menor que los resultados encontrados por Koji NARUI en el que la CMB para hipoclorito de sodio después de 5 min de enfrentamiento con cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue de 64 µg / ml (64 ppm), para todas las cepas ensayadas (Narui *et al.*, 2007) y también menor a los resultados encontrados por Deshaies Francis que fueron 82 mg/L (82ppm) para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en el mismo tiempo de enfrentamiento (Deshaies *et al.*, 2012).

La dilución de los desinfectantes, que son las CMB, para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 es de 1/32 y 1/16 de la dilución recomendada por el fabricante para Green Desinfectant y Forward respectivamente. Y para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue de 1/128 y 1/64 de la dilución recomendada por el fabricante para Green Desinfectante y Forward respectivamente, encontrándose diluciones semejantes por Deshaies Francis para un desinfectante de amonio cuaternario de cuarta generación, esta fue 1/64 de la dilución recomendada por el fabricante para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 además la dilución para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fue de 1/128 de la dilución recomendada por el fabricante (Deshaies *et al.*, 2012).

Dado que la CMB de un desinfectante para un grupo de cepas es la mayor CMB entre las cepas, la CMB de Green Desinfectant para las cepas aisladas de las superficies ambientales de la clinica A, que es 0.0521, es igual a la CMB de la clinica B. La CMB de Forward para las cepas aisladas de las superficies ambientales de la clinica

A, que es 0.1563, es igual a la CMB de la clinica B. Indicándome esto semejanza en la sensibilidad frente a los desinfectantes a base de amonio cuaternario, Green Desinfectant y Forward, por parte de las cepas aisladas de la clinica A y la clinica B. Esto es diferente para el hipoclorito de sodio dado que la CMB de la clinica A, para las cepas aisladas de las superficies, es mayor que la CMB de la clinica B siendo estas 0.005 y 0.001 respectivamente, indicándome que la sensibilidad al hipoclorito de sodio por parte de las cepas ensayadas de la clinica A es menor a las cepas ensayadas de la clinica B.

VII. CONCLUSIONES

1. La flora bacteriana presente en las superficies ambientales del área de quirófano de las clínicas A y B son diferentes y las bacterias patógenas oportunistas más frecuentes del área de quirófano de la clínica A son SCN y *Bacillus sp.* y de la clínica B son SCN y *Bacillus sp.*
2. Las concentraciones adecuadas de neutralizante para los ensayos de dilución-neutralización en la evaluación de los desinfectantes fueron polisorbato 80 al 2% más lecitina al 2,5% para Green Desinfectant y Forward y 1% de tiosulfato de sodio para hipoclorito de sodio.
3. El desinfectante con mayor actividad bactericida fue el hipoclorito de sodio, con una CMB de 0,005% (v/v) y entre los dos desinfectantes a base de amonio cuaternario el desinfectante Green Desinfectante fue el más eficiente con una CMB de 0,0521% (v/v).
4. Todos los desinfectantes estudiados presentaron actividad bactericida porque redujeron, el número de ufc en al menos 5 unidades logarítmicas.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de tipo 2 para determinar la actividad antimicrobiana específica para una determinada aplicación y bajo condiciones similares a la práctica.
2. Debido a que la mayoría de las cepas ensayadas, aisladas de las superficies, fueron aisladas después del proceso de desinfección y los desinfectantes utilizados presentaron actividad bactericida para las cepas ensayadas se debería evaluar al procedimiento seguido o la presencia de sustancias interferentes

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ABREGU ROQUE, Miguel y TAPIA MANRIQUE, Edgar.** “Evaluación de desinfectantes y antisépticos utilizados en áreas críticas del Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara”. Asesor: Gerardo Gamarra. Tesis título profesional UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 1998.
- **AENOR,** “Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos”. UNE-EN 1040:2006.
- **AHLSTRÖM, B., THOMPSON, R. and EDEB , L.** The effect of hydrocarbon chain length, pH, and temperature on the binding and bactericidal effect of amphiphilic betaine esters on *Salmonella typhimurium*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 1999, vol. 106, nº 1-6, p. 318-324.
- **ALEJO ESPINOZA, Mercedes Mirtha y BUENDÍA TARMEÑO, Blanca Isabel.** “Control Microbiológico en el servicio de Emergencia del Hospital 2 de Mayo”. Asesora: Dina Alcántara. Tesis título profesional UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 1992.
- **ÁLVAREZ, A., ESPIGARES, E. y GÁLVEZ R.** Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2001. vol. 1, p.1-5.

- **BOND WW, SEHULSTER L.** 2010. Microbiological assay of environmental and medical-device surfaces, p 13.10.1 to 13.10.12 *In* Isenberg HD, editor. (ed), Clinical microbiology procedures handbook, vol 3 American Society for Microbiology, Washington, DC
- **BOLIS, Mónica.** INFECCIONES HOSPITALARIAS LEGISLACIÓN EN AMÉRICA LATINA. Organización Panamericana de la Salud. [Internet] Washington, D.C: OPS, 2007. [citado 29-04-2012.] Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Legislacion_Salud_Infecciones_Hospitalarias_AL.pdf
- **BOYCE, JM., POTTER-BYNOE, G., CHENEVERT, C and KING, T.** Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1997, vol. 18, nº 9, p. 622-627.
- **BLOOMFIELD, S. F.** *Handbook of disinfectants and antiseptics* J. M. Ascenzi (ed.),. *In* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1996. [citado 29-03-2015] disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=tFPW4D70BmgC&printsec=frontcover&dq=Handbook+of+disinfectants+and+antiseptics&hl=es&sa=X&ei=j9gVVb3lE4vEgwTv34O4CA&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Handbook%20of%20disinfectants%20and%20antiseptics&f=false>
- **BRANNAN, Daniel K.** (1997) *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- **CALDERÓN, Enrique.** Investigación de reservorios ambientales de bacterias causantes de infecciones hospitalarias; Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, nº28. Buenos Aires: RIPARI S.A., 1989. ISBN: 950-710-016-4.
- **CCOPA CÁRDENAS, David I.** “Estudio microbiológico y epidemiológico ambiental de los servicios de Gineco-Obstetricia en 10 hospitales maternos-infantiles de la sub-región de salud II Lima Sur”. Asesora: Dina Alcántara Tesis título profesional UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 1995.
- **DAOUD, N.N.D., DICKINSON, N.A. and GILBERT, P.** Antibacterial activity and physico-chemical properties of some alkyl-dimethylbenzyl ammonium chlorides. *Microbios*. 1983, vol. 37, nº 148, p. 73-85.
- **DESHAIES, Francis, AHMAD, Darakhshan, MASSICOTTE, Richard, PICHETTE, Gilbert, BELHUMEUR, Pierre and ASSANTA, Mafu Akier.** Comparison of efficacy profiles for minimum lethal concentrations (MLCs) of some commonly used commercial hospital microbicidal detergent-disinfectant products for disinfectants and sporicidal activity. *International Journal of Infection Control*. 2012, vol. 8, nº 2.
- **DUCEL, G., FABRY, J., NICOLLE, L.** Prevención de las infecciones nosocomiales GUÍA PRÁCTICA 2nd ed. Lyon y Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2002 [citado 17-08-214] Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67877/1/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.1_2_spa.pdf

- **EKRAMI, Alireza, KAYEDANI, Abbas, JAHANGIR, Mohammad, KALANTAR, Enayat, JALALI. Mohammad.** Isolation of common aerobic bacterial pathogens from the environment of seven hospitals, Ahvaz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2011, vol. 4, n° 2, p. 75-82.
- **EMBIL, John M., MCLEOD, Judy A., AL-BARRAK, Ali M., THOMPSON, Genevieve M., AOKI, Fred Y., WITWICKI, Evelyn J., STRANC, Mirek F., KABANI, Amin M., NICOLL, Debbie R. and NICOLLE, Lindsay E.** An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on a burn unit: potential role of contaminated hydrotherapy equipment. *Journal of the international society of burns injuries*. 2001, vol. 27, n° 7, p. 681-688.
- **FERREIRA, C., PEREIRA, A., PEREIRA, M., MELO L. and SIMÕES M.** Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Antimicrob Chemother*. 2011, vol. 66, p. 1036-1043.
- **GARCIA L.** Microbiological Assay of Environmental and Medical-Device Surfaces, In *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC, 2010, p 485-496.
- **GARRITY, GEORGE M., BRENNER, DON J., KRIEG, NOEL R., STALEY, JAMES T. BERGEY'S MANUAL OF SISTEMATIC BACTERIOLOGI**, 2nd ed., editorial board, Volumen 3, 2012.
- **GEBEL, Jürgen, EXNER, Martin, FRENCH, Gary, CHARTIER, Yves, CHRISTIANSEN, Bärbel, GEMEIN, Stefanie, GORONCY-BERMES, Peter, HARTEMANN, Philippe, HEUDORF, Ursel, KRAMER, Axel, MAILLARD,**

- Jean-Yves, OLTMANN, Peter, ROTTER, Manfred and SONNTAG, Hans-Günther.** The role of surface disinfection in infection prevention. *GMS Hygiene and Infection Control*. 2013, Vol. 8, n°1, ISSN 2196-5226.
- **GILBERT, P., MOORE, L.E.** Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, Vol. 99, n°4, 703-715.
 - **GNEAUPP (Grupo Nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión y heridas crónicas).** Recomendaciones sobre la utilización de antisépticos en el cuidado de heridas crónicas. 2002. http://www.gneaupp.es/app/adm/documentos-guias/archivos/16_pdf.pdf
 - **GOODMAN, Eric R., PLATT, Richard, BASS, Richard, ONDERDONK, Andrew B., YOKOE, Deborah S., HUANG, Susan S.** Impact of an Environmental Cleaning Intervention on the Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci on Surfaces in Intensive Care Unit Rooms. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2008, vol. 29, n° 7, p. 593-599.
 - **HERNÁNDEZ RODRIGUEZ, Águeda.** “Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes”. Asesor: Vicenç Ausina Ruiz. Tesis grado de Doctora Universidad Autónoma de Barcelona, Facultat de Ciències Departament de Genètica y Microbiologia, Barcelona, 2006.
 - **INTITUTO NACIONAL DE SALUD.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Serie de normas técnicas N° 28. Lima: INS, 2005.

- **IOANNOU Christopher J., HANLON Geoff W. and DENYER Stephen P.** Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, vol. 51, n° 1, p. 296-306.
- **KELSEY JC, BEEBY MM, WHITEHOUSE CW.** A capacity use-dilution test for disinfectants. *Mon Bull Ministry Hlth*. 1965. Vol. 24, p152-60.
- **KHANNA N. and NAIDU, A.S.** *Natural Food Antimicrobial Systems*. Boca Raton: CRC Press. Naido, A.S., 2000 [Citado29-03-2015] disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=rmdPO9BNBcC&pg=PA741&lpg=PA741&dq=Chlorocides.+In+Natural+Food+Antimicrobial+Systems&source=bl&ots=8kwNIEDz5h&sig=HBZPuXyPi1FjZfU4kP1ZETanSIU&hl=es&sa=X&ei=mRcYVb_rFMewggS6ooKgAg&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Chlorocides.%20In%20Natural%20Food%20Antimicrobial%20System&f=false> ISBN: 0-8493-2047
- **KOCH R.** Über Desinfektion. *Mitt kaiserl Gesundheitsamte*. 1881, vol.1, p.234-282.<[Citado29-03-2015]disponible en <http://edoc.rki.de/documents/rk/508-287-338/PDF/287-338.pdf>>
- **MCDONNELL Gerald and RUSSELL A. Denver.** Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, vol. 12, n° 1, p. 147-179.
- **MAMANI URQUIZO, Irma.** “Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en cepas bacterianas ATCC y cepas aisladas del área de

fabricación de productos estériles, realizando pruebas de dilución “in use” en laboratorios Bagó de Bolivia S.A.” Tesis título profesional Universidad Mayor de San Andrés Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas, Carrera de bioquímica, La Paz, 2008.

- **MINISTERIO DE SALUD.** Norma técnica de prevención y control de infecciones intrahospitalarias. NTP 020, Lima: MINSA, 2004.
- **MUTO, Carlene A., JERNIGAN, John A., OSTROWSKY, Belinda E., RICHEL, Hervé M., JARVIS, William R., BOYCE, John M., FARR, Barry M.** Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2003, vol. 24, n° 5, p. 362-386.
- **NARUI, Koji, TAKANO, Mitsuo, NOGUCHI, Norihisa and SASATSU Masanori.** Susceptibilities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates to Seven Biocides. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2007, vol. 30, n° 3, p. 585-587.
- **LAMBERT, P.A. and HAMMOND, S.M.** Potassium fluxes, first indications of membrane damage in microorganisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1973, vol. 54, n° 2, p. 796-799.
- **OIE, S. and KAMIYA, A.** Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on naturally contaminated dry mops. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2003, vol. 34, n° 2, p. 145-149.

- **ORIHUELA QUIVAQUI, Kira Ruth.** “Evaluación de desinfectantes frente a cepas de bacterias ambientales aisladas del hospital central de la policía-Lima”. Asesora: Elena Quillama. Tesis título profesional UNMSM, EAP Microbiología y Parasitología, Lima, 1998.
- **OTTER, Jonathan A., YEZLI, Saber and FRENCH Gary L.** The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2011, vol. 32, n° 7, p. 687-699
- **PERÚ,** Resolución Ministerial 1472-2002 SA/DM, 10 de setiembre. *El Peruano* 13 de setiembre de 2002, num. 8119, p. 299897
- **PERÚ,** Resolución Ministerial 372-2011/MINSA, 16 de mayo. *El Peruano* 19 de mayo de 2011, num. 11404, p. 442751
- **REYBROUCK, Gerald.** Milestones in the testing of surface disinfectants: from Robert Koch to CEN TC 216. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*. 2007, Vol. 2, n°1, p. 1-5.
- **RIDEAL S. and WALKER JTA.** The standardisation of disinfectants. *J roy sanit Instit.* 1903, Vol. 24, p.424-41.
- **ROMERO LEÓN, Carlos Enrique.** “Evaluación de desinfectantes mediante el método de Kelsey-Sykes modificado usando el medio D/E Neutralizing Agar (Difco)”. Asesor: Gerardo Gamarra. Tesis título profesional UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 2000.

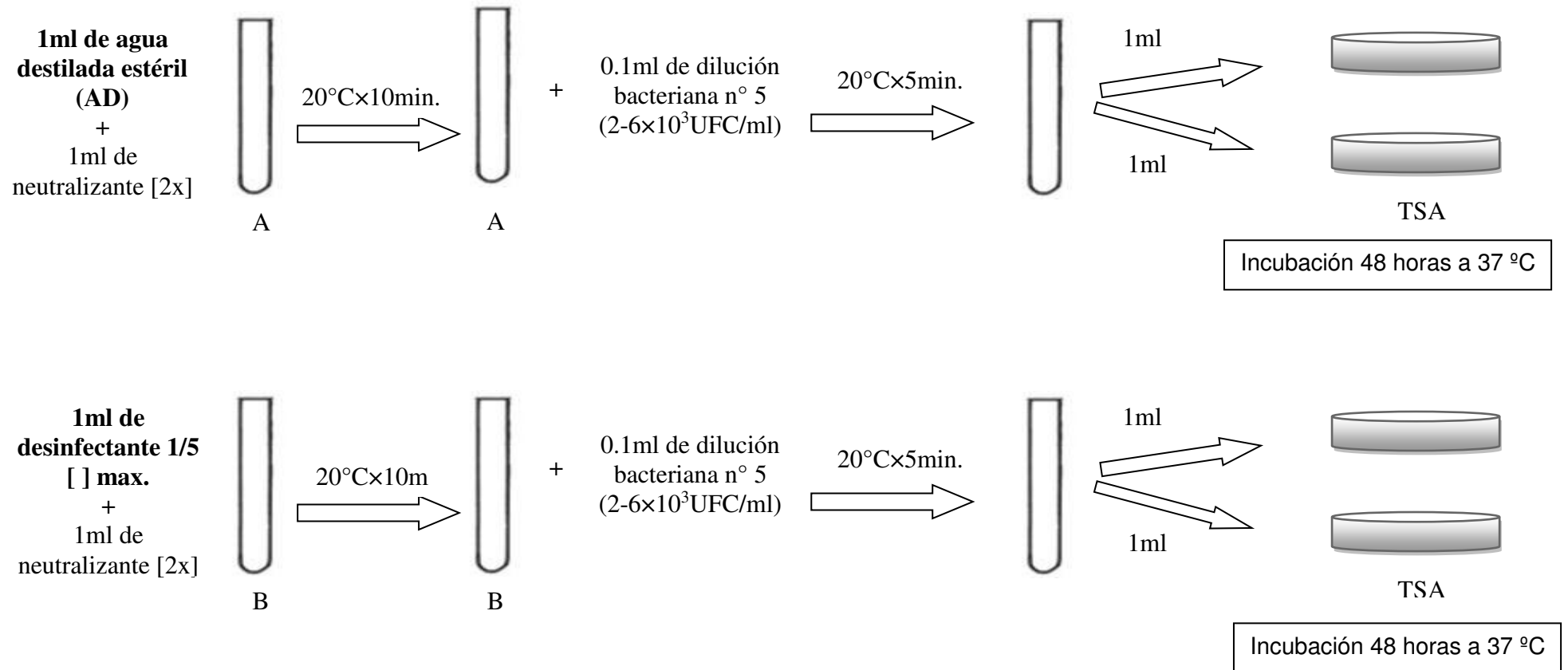
- **RUTALA, William A. and WEBER David J.** The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control*. 2004, Vol. 32, p.226-23.
- **SALT, W.D. and WISEMAN, D.** Relationship between uptake of cetyltrimethylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.1970, Vol. 22, n°4, p. 261-264.
- **SALTON, M.R.J.** The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology* 1951, Vol. 5, n°2, p. 391-404.
- **SMITH Karen and HUNTER Iain S.** Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2008, vol. 57, p.966–973.
- **SMITH, Theresa L., IWEN, Peter C., OLSON, Susan B. and RUPP, Mark E.** Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci in an Outpatient Setting. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1998, vol. 19, n° 7, p. 515-518.
- **SUTTON SVW.** Neutralizer evaluations as control experiments for antimicrobial efficacy test. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. Ascenzi ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996.[Citado 14-10-2015] disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=tFPW4D70BmgC&pg=PA43&lpg=PA43&dq=Neutralizer+evaluations+as+control+experiments+for+antimicrobial+efficacy+test>

[acy+test.&source=bl&ots=pJk0yr4fs&sig=5dZGsG7OzRi6TsvyyWHYCgxl8hE&hl=es&sa=X&ved=0CB8Q6AEwAGoVChMlr7LinZbDyAlVidYeCh3Y-qin#v=onepage&q=Neutralizer%20evaluations%20as%20control%20experiments%20for%20antimicrobial%20efficacy%20test.&f=false>.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17511111) ISBN. 0-8247-9524-5

- **TABOADA, A., SANCHEZ, E., CAVA, R., MARIN, F., LOPEZ, A.** Efectividad de desinfectantes de superficies de los equipos en instalaciones de envasado de productos listos para su consumo. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones. 2007, p. 887-892.
- **TOTE', K., HOREMANS, T., VANDEN BERGHE D., MAES, L., COS, P.** Inhibitory Effect of Biocides on the Viable Masses and Matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, vol. 76, n°10, p. 3135–3142.
- **YAGUI MOSCOSO, Martin.** Análisis de situación de las infecciones intrahospitalarias en Perú 1999 – 2000. Ministerio de Salud. Lima, 2000. Disponible en internet: http://bvs.minsa.gob.pe/local/OGE/237_OGE29.pdf.

X. ANEXO 01

A. Ensayo de neutralización



B. Ensayo para determinar la CMB de los desinfectantes

